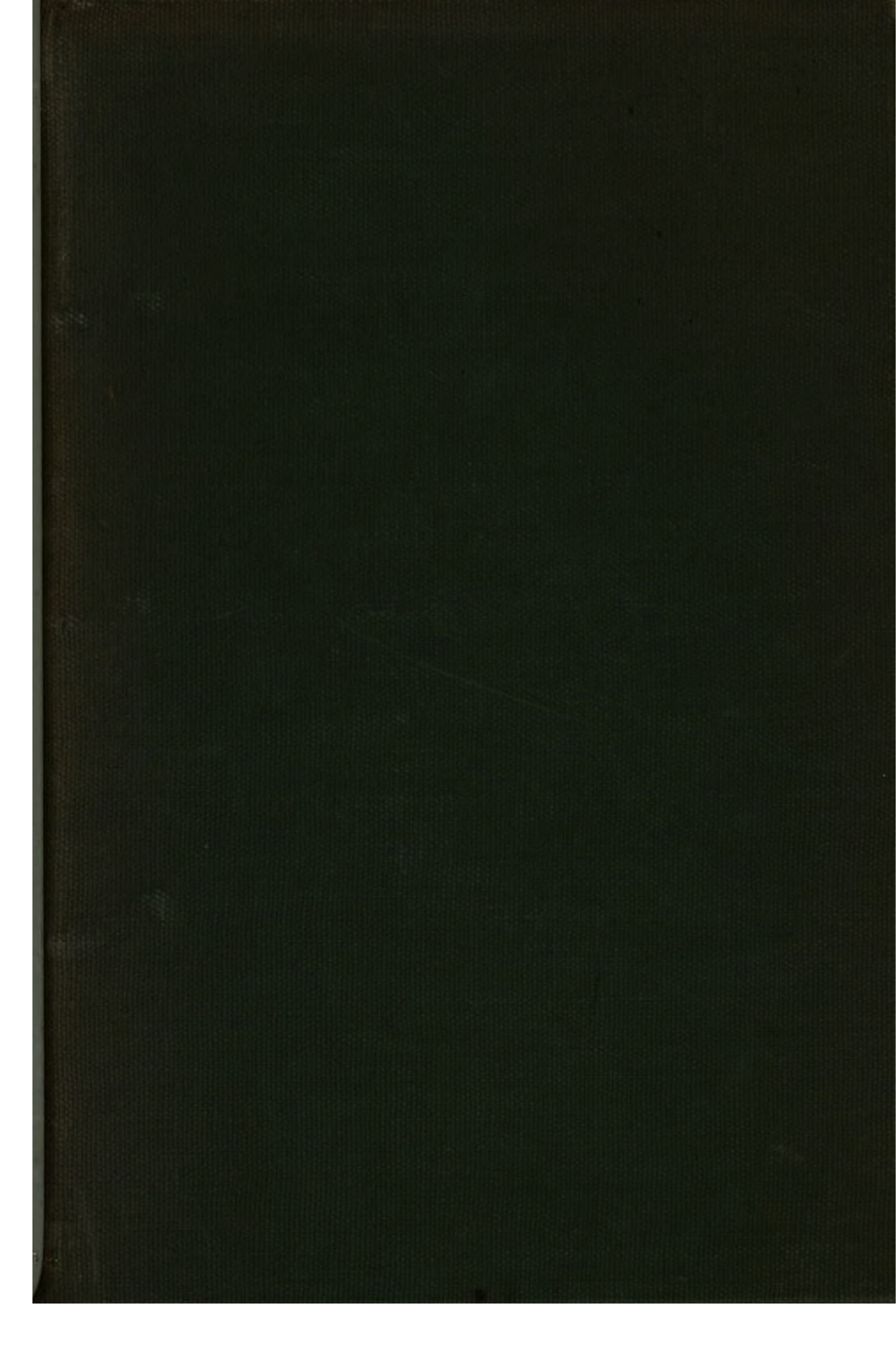
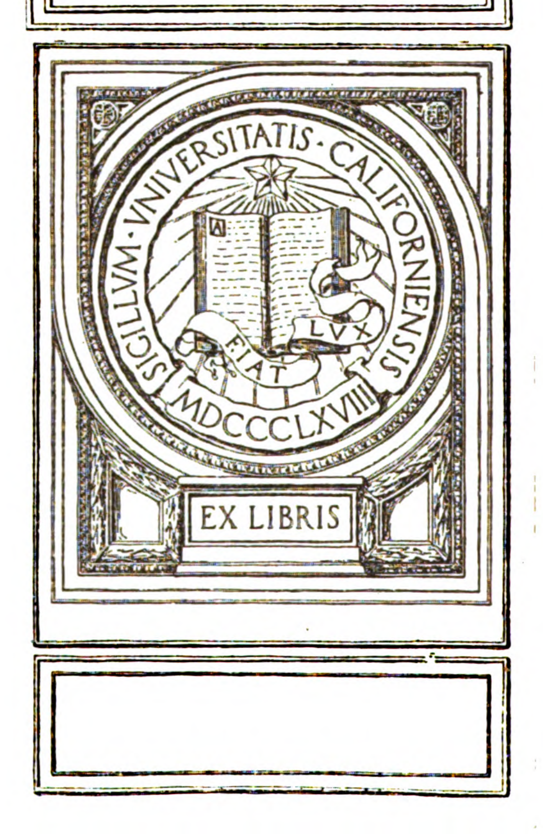
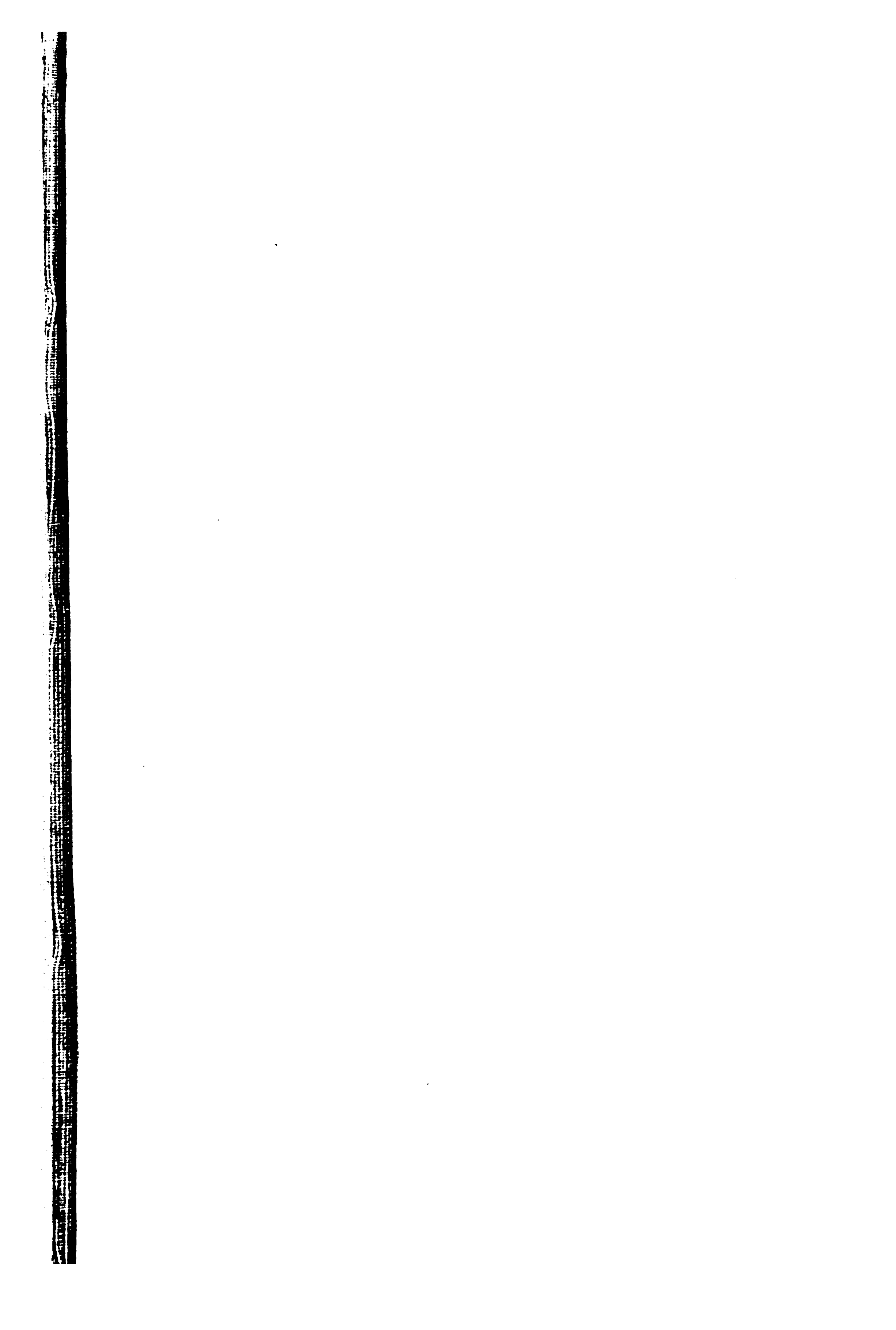



MEDICAL SCHOOL
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS











ZEITSCHRIFT
FÜR
HYGIENE
UND
INFEKTIONSKRANKHEITEN

BEGRÜNDET VON ROBERT KOCH UND CARL FLÜGGE

HERAUSGEGEBEN

VON

F. NEUFELD
BERLIN

M. HAHN
BERLIN

R. DOERR
BASEL

106. BAND
MIT 87 TEXTABBILDUNGEN



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1926

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

Inhaltsverzeichnis.

Heft 1.

(Abgeschlossen am 18. März 1926.) Seite

Heft 2.

(Abgeschlossen am 24. Juni 1926.)

Heft 3.

(Abgeschlossen am 11. September 1926.)

Heft 4.

(Abgeschlossen am 28. Oktober 1926.)

(Aus dem Institut „Robert Koch“.)

Weitere Untersuchungen über die Bedeutung der Staubinfektion bei der Tuberkulose.

Von

Prof. **B. Lange,**

Abteilungsleiter am Institut.

Mit 2 Textabbildungen.

In früheren Untersuchungen mit *Nowosselsky* konnte ich nachweisen, daß die Infektion von Meerschweinchen durch Einatmung tuberkelbacillenhaltigen Staubes mit größter Sicherheit auch dann gelingt, *wenn nur einzelne wenige Bacillen in die Lunge eindringen*. Damit ist ein wichtiges Argument widerlegt, das im besonderen von Flügge und seiner Schule immer wieder gegen eine größere praktische Bedeutung der Staubinfektion ins Feld geführt ist. Nun handelt es sich bei unseren Versuchen aber um eine Versuchsanordnung, die den natürlichen Infektionsbedingungen nicht entspricht. Die Tuberkelbacillen wurden einer Kultur entnommen, bei 37° 24 Stunden getrocknet, dann mit einem sehr feinen Pulver (Talcum) vermengt und in künstlichem Apparat verstäubt. Die Versuche sagen also für sich noch nichts darüber aus, inwieweit *in der Praxis* mit einer Lungeninfektion durch Einatmung feinsten bacillenhaltigen Staubes zu rechnen ist. Möglicherweise findet unter natürlichen Verhältnissen in der Regel keine so vollständige Trocknung von bacillenhaltigem Sputum statt, daß aus dem getrockneten Sputum feinster Staub entstehen kann. Oder die Menge eines solchen feinen Staubes ist zu gering, um unter natürlichen Bedingungen als ernstliche Gefahr zu gelten. Auch mit einer schnellen Virulenzabschwächung der dem Trocknen unterworfenen Sputumbacillen und mit einem baldigen Absterben derselben muß gerechnet werden. In diesem Falle würde ebenfalls die Ansteckungsgefahr eine Verminderung erfahren. Vielleicht sind auch die auf die nähere Umgebung des Kranken verstreuten bacillenführenden *Hustentröpfchen* an dem Gegenstand, den sie beschmutzen, so fest fixiert, daß sie für gewöhnlich gar nicht in Staubform zur Ablösung kommen.

Die über diese Fragen vorliegenden Untersuchungen von *Cornet*, *Flügge*, *B. Heymann*, *Neisser*, *Sticher*, *Beninde*, *Kirstein*, *Noetel*, *Kuß*, *Chaussé* u. a. scheinen mir nach mancher Richtung hin einer Ergänzung

zu bedürfen. Ja manche Fragen wie die praktisch so ungemein wichtige nach der Virulenzabschwächung der Tuberkelbacillen infolge Trocknens sind in exakter Weise experimentell, soviel ich sehe, überhaupt noch nicht geprüft worden. Ich habe deshalb versucht, die bestehenden Lücken durch eigene Experimente auszufüllen.

Meine Untersuchungen gliedern sich nach ihrem Thema in drei Abschnitte. Erstens wurde untersucht, unter welchen Bedingungen sich Keime, die in *Tröpfchen* auf verschiedenartige Gegenstände verstreut werden, *in Form feinen Staubes* von ihrer Unterlage ablösen, zweitens, inwieweit beim Trocknen von Tuberkelbacillen in dünnster Sputumschicht mit einem *Absterben* der Keime und mit einer *Virulenzabsschwächung* zu rechnen ist, drittens, in welchem Umfange eine *primäre Lungeninfektion* bei empfänglichen Versuchstieren *durch* angetrocknete, dann *verstäubte bacillenführende Hustentröpfchen* zu erwarten ist.

In einem vierten Abschnitt soll versucht werden, an der Hand des vorliegenden Tatsachenmaterials zu einer *Bewertung der Staubinfektionsgefahr unter natürlichen Bedingungen* zu gelangen.

I. Die Bedingungen des Trocknens und der Verstäubbarkeit Prodigiosuskeime enthaltender Tröpfchen.

Während wir durch die Untersuchungen von *Arnold*, *Flügge und Stern*, *K. B. Lehmann* und seiner Schule[1]), sowie mehrerer anderer Autoren über eine Reihe von Momenten gut orientiert sind, die für die Verbreitung von Infektionskrankheiten durch trocknen Staub von größter Wichtigkeit sind, z. B. über den Anteil feinsten flugfähigen Staubes in verschiedenen natürlichen Staubarten, über die Körnchengröße dieses feinen Staubes, seine enorme Schwebefähigkeit und Transportierbarkeit durch minimale, unter der Grenze des Wahrnehmbaren liegende Luftströmungen, die Fähigkeit solchen feinsten Staubes, mit der eingeatmeten Luft tief in die menschlichen oder tierischen Lungen einzudringen, liegen wenig Untersuchungen vor über die Bedingungen, unter welchen eine Verstäubung *keimhaltiger flüssiger Ausscheidungen des Menschen und der Tiere stattfindet, die an verschiedenen Objekten antrocknen.*

Von großem Interesse sind in dieser Beziehung die nicht genügend gewürdigten Experimente *B. Heymanns*, welche dartun, daß auf Kleidungsstücke gespritzte keimhaltige Flüssigkeit nach dem Antrocknen leicht in Staub übergehen kann. Von diesem Staub ist nach *B. Heymann* stets ein Teil so fein, daß er durch schwache Luftströmungen bis in die entlegensten Winkel eines Raumes fortgeführt wird.

Flügge hat nun wiederholt mit Nachdruck die Auffassung vertreten, daß das an verschiedene Gegenstände, beispielsweise den Fußboden und das Taschentuch, antrocknende Sputum des Phthisikers nur selten

[1]) Literatur bei *B. Lange* und *Nowosselsky*.

imstande sei, in flugfähigen Staub überzugehen. Erstens soll nach *Flügge* Sputum für gewöhnlich überhaupt nicht so vollkommen trocknen, daß feinster Staub aus ihm entstehen kann, zweitens sollen starke mechanische Erschütterungen verbunden mit starken Luftströmen, die allein imstande sind, das angetrocknete Sputum von seiner Unterlage abzulösen und in Staub zu verwandeln, unter natürlichen Bedingungen nur ausnahmsweise vorkommen.

Was den letzten Punkt betrifft, so kann ich der *Flügge*schen Ansicht schon auf Grund von Erfahrungen des täglichen Lebens nicht beitreten. *Mir scheinen im Gegenteil derartige starke mechanische Einwirkungen in bewohnten Räumen recht häufig vorzukommen.* Dabei denke ich in erster Linie an Hantierungen in Wohnräumen: das trockene Fegen des Fußbodens, das Abbürsten des Teppichs, Bürsten der Kleider und des Schuhwerks, an das „Bettenmachen", ferner an das Laufen und Herumrutschen von Kindern auf dem Fußboden, ferner an die mannigfachen beruflichen Hantierungen, die Staub erzeugen und sich nicht selten in engen Bureaus, Werkstätten usw. abspielen.

Auch das andere Argument scheint mir nicht hinreichend durch Erfahrungen des täglichen Lebens und experimentelle Beobachtungen gestützt zu sein. *Flügge* beruft sich auf Beobachtungen im Laboratorium an großen zusammenhängenden Sputumballen. In der Tat ist, worauf auch *Cornet* hinweist, eine vollständige Trocknung derartiger Sputummassen nur schwer zu erreichen. Aber in der Praxis kommen *verhältnismäßig selten* größere Sputummassen als Infektionsquellen in Betracht. In der Hauptsache handelt es sich doch um *kleine und kleinste* Sputummengen, die auf dem Fußboden, an der Kleidung, an Taschentüchern usw. antrocknen. Die Bedingungen des Trocknens und der Verstäubung solcher Sputumteilchen, im besonderen auch irgendwo antrocknender Hustentröpfchen sind nun höchstwahrscheinlich ganz andere. Inwieweit das zutrifft, das kann nur durch ad hoc angestellte Experimente geklärt werden, die die Bedingungen des Trocknens und der Verstäubbarkeit kleinster Mengen keimhaltiger Flüssigkeit, im besonderen auch keimhaltiger Sputumtröpfchen, zum Gegenstand haben.

Ich habe eine Reihe solcher Experimente angestellt und will im Folgenden kurz über ihr Ergebnis berichten.

Wie *B. Heymann* in seinen Versuchen benutzte ich Prodigiosusbakterien, aber nicht nur Bouillonkulturen, sondern ich schwemmte die Keime auch in konzentriertem Sputum eines Bronchitikers auf. Die Bouillonkulturen bzw. Sputum-Aufschwemmungen wurden nun in Form von gröberen und feineren Tröpfchen auf verschiedene Gegenstände verstreut und das Trocknen der Tröpfchen abgewartet. Kürzere oder längere Zeit nach dem Trocknen der Tröpfchen wurden die betreffenden Gegenstände starken mechanischen Einwirkungen ausgesetzt und in dem Raum, in dem dies geschah, zum Nachweis des sich bildenden keimhaltigen Staubes Agarplatten aufgestellt.

Nur in einem Versuch (V. 1 der Tabelle) fand eine Versprühung von Bouillonkultur mittels Sprays statt, der hauptsächlich feinste Tröpfchen von 4—20 μ Durchmesser lieferte, in den meisten anderen Versuchen wurden gröbere Tröpfchen entsprechend der Größe der Hustentröpfchen verstreut durch einen eigens hierzu konstruierten Spray. In 2 Versuchen wurde Bouillonkultur mit dem Munde versprüht (10 und 11), in 2 anderen (5 und 7) fand die Verunreinigung des Gegenstandes (Taschentuch) durch Sputumtropfen statt, die aus einer Pipette herabfielen. Um eine Infektion der Platten durch *frische* Tröpfchen ganz auszuschließen, fand die Versprühung des keimhaltigen Materials stets außerhalb und in großer Entfernung von dem Raum statt, in dem die Abstäubung der Objekte vorgenommen wurde (vielfach im Freien bei bewegter Luft).

Folgende Gegenstände wurden mit Tröpfchen benetzt: ein baumwollenes Staubtuch, ein leinenbaumwollenes Taschentuch, ein wollener Militärwaffenrock, endlich der Fußboden verschiedener Institutsräumlichkeiten. Während Staubtücher und Taschentücher in sauberem Zustande benutzt wurden, war der Waffenrock stark verstaubt. Der Fußboden der Versuche 13 und 14 (Laboratoriumsräume) war sauber und fast staubfrei, in den Versuchen 12 und 15 stark beschmutzt (Räumlichkeiten zum Abstellen von Gerät usw.). Trotzdem in den beiden erstgenannten Versuchen die bis dahin täglich vorgenommene Reinigung des Fußbodens mit einem Desinfiziens am Tage vor Anstellung des Experiments unterblieb, muß hier mit einer gewissen bactericiden Wirkung seitens etwaiger dem Boden noch anhaftender Reste des Desinfiziens gerechnet werden.

Das Antrocknen der Tröpfchen an den Gegenständen geschah unter natürlichen Bedingungen, Staubtuch, Taschentuch und Waffenrock wurden in einem Laboratoriumsraum frei aufgehängt bzw. auf einem Tisch ausgebreitet, die auf dem Fußboden verstreuten Tröpfchen dem spontanen Trocknen bei ruhender Luft und einer Temperatur von 16—18° überlassen[1]). 1—2 Stunden, in einigen Versuchen auch 24 Stunden nach der Verunreinigung durch prodigiosushaltige Tröpfchen wurden Staubtuch, Taschentuch und Rock mehrmals stark ausgeschüttelt. In den Fußbodenversuchen 13 und 14 wurde 24 Stunden nach dem Ausstreuen der Tröpfchen auf dem Fußboden längere Zeit hin- und hergegangen, während gleichzeitig in dem Zimmer die Platten exponiert waren; in den Fußbodenversuchen 12 und 15 wurde der Fußboden mit einem Besen trocken gefegt. In diesen Versuchen ist also im Gegensatz zu den Versuchen 13 und 14 Gelegenheit zu reichlicher Staubentwicklung gegeben.

Zur Aufnahme der infolge der stauberzeugenden Manipulation sich ablösenden Keime wurden mehrere Agarplatten teils sofort geöffnet, teils erst nach 5 Min. bzw. 1 Stunde. Diese letzteren beiden Serien von Platten sollten Aufschluß geben über den jeweiligen Anteil des Staubes an *feinstem schwebefähigen Material*. Der gröbere Anteil des Staubes sinkt bekanntlich innerhalb der ersten 5 Min. zu Boden. Die Agarplatten waren größtenteils auf dem Fußboden bzw. in einer Höhe von 20—40 cm über dem Fußboden auf Gestellen, zum kleineren Teil auf einem 2 m über dem Fußboden befindlichen Holzbrett und auf einem 1,20 m hohen Tisch in der Mitte des Zimmers ausgelegt. Die Expositionsdauer betrug in der Regel 24 Stunden. Das Öffnen der Platten geschah meist durch eine in dem betreffenden Zimmer befindliche Person, teils durch Zug an einer Schnur seitens des außerhalb des Raumes befindlichen Experimentators. Die Schnur war dabei mittels Heft-

[1]) Ergänzende, zur Zeit noch nicht abgeschlossene Versuche mit Taschentüchern, die nach der Bestreuung mit Sputumtröpfchen eine gewisse Zeit in der *Rocktasche* getragen wurden, haben bisher ergeben, daß bei dieser Versuchsanordnung das Trocknen der Sputumtröpfchen sich etwas verzögert, im übrigen die Resultate aber durchaus denjenigen der Tab. 1 entsprechen.

pflasters an dem Deckel der Petrischalen befestigt und führte über einen horizontalen, genau über der Platte befindlichen Holzbalken und dann durch ein Loch in der Tür nach außen. Durch diese Versuchsanordnung sollten Versuchsfehler vermieden werden, die bei dem Öffnen der Platten seitens einer in dem Raum selbst hantierenden Person nicht auszuschließen sind. Allerdings waren Unterschiede in den Ergebnissen nach der einen und nach der anderen Methode des Plattenöffnens nicht deutlich, auch konnte der erw. Versuchsfehler durch mikroskopische Besichtigung der auf dem Agar gewachsenen Kolonien mit schwacher Vergrößerung gut kontrolliert werden. Es zeigte sich regelmäßig, daß auf den sofort exponierten Platten das Keimwachstum vielfach von mehreren millimeterlangen Baumwollleinenfäden usw. ausgegangen war. Dagegen konnten auf den zu späterer Zeit exponierten Agarplatten gröbere Staubpartikelchen in der Regel nicht nachgewiesen werden.

Die Größe des Raumes, in dem das Abstäuben der Staubtücher usw. hauptsächlich vorgenommen wurde, betrug 30 cbm, einige Male wurde ein noch größerer Raum zu den Versuchen verwandt.

Die Tab. 1 enthält eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Die Versuche geben auf eine Reihe von Fragen eine klare Antwort.

Zunächst geht aus ihnen mit Sicherheit hervor, daß Sputumtröpfchen von der Beschaffenheit der natürlichen Hustentröpfchen *bereits nach einer Stunde* so vollkommen getrocknet sind, daß sie unter der Einwirkung mechanischer Erschütterung, verbunden mit starken Luftströmungen sich in Staubform von wollenen Tüchern, Taschentüchern, Röcken, über die sie verstreut worden sind, *leicht ablösen*, ferner daß ein Teil dieses Staubes aus feinen Partikelchen besteht, welche sich längere Zeit schwebend in der Luft halten können. Offenbar haften dabei die Keime oft an feinen Staubteilchen, mehrfach konnten aber auch Kolonien von Prodigiosus auf den Platten beobachtet werden, die feinstes von den betreffenden Objekten stammendes Material in oder neben der Kolonie nicht aufwiesen. Diese Beobachtung spricht dafür, daß in Tröpfchen verstreute Keime sich nach dem Trocknen der *Tröpfchen in isoliertem Zustande oder vielleicht auch in Form kleinster Bacillenbündelchen* ablösen können. Wie wir aus den Untersuchungen von *Flügge* und *Stern* und aus zahlreichen anderen Beobachtungen wissen, reinigt sich die Luft eines Zimmers von solchem feinsten Bakterienstaub erst nach mehreren Stunden.

Was die Größe dieses Anteils feinsten flugfähigen Bakterienstaubes innerhalb der erzeugten Staubmenge betrifft, so können wir ihn aus einer Reihe von Versuchen ungefähr berechnen. Von dem im Versuch 4 von einem sauberen Taschentuch gewonnenen Staub fanden sich 8% der Keime noch nach einer Stunde schwebend in der Luft, im Versuch 9 (Abstäuben eines Waffenrockes) nach 5 Minuten etwa 22%, nach 1 Stunde noch etwa 1,5%, im Versuch 10 nach 5 Minuten etwa 24%, nach 1 Stunde 2% der Keime. *Stern* fand demgegenüber, daß in ruhigem Zimmer nach dem Aufwirbeln eines *künstlichen Gemenges* von Prodigiosus und nicht besonders ausgewähltem Material von Zimmerstaub

Tabelle 1.

Bedingungen des Trocknens und der Verstäubbarkeit an verschiedenen Gegenständen haftender Tröpfchen, die Prodigiosuskeime enthalten.

Versuch Nr.	Art der Versprühung und versprühtes Material	Besprühter Gegenstand	Wielange nach d. Versprühung wurde eine Abstäubung der Gegenstände vorgenommen?	Prodigiosuskeime nachgewiesen			
				unmittelbar n. d. Verstäubg.		5 Min. nach der Abstäubung bis 1 m Höhe	1 Std. nach der Abstäubung bis 1 m Höhe
				auf Fußboden und Gegenständen bis 1 m Höhe	über 1 m Höhe		
1	mit feinem Spray Bouillonkultur	Staubtuch	$1^1/_2$ Std.	362 (13)	56 (11)	—	—
2	mit grobem Spray Bouillonkultur	Staubtuch	2 „	25 (10)	1 (7)	0 (3)	—
3	mit grobem Spray Bouillonkultur	Staubtuch	2 „	600 (15)	22 (10)	—	—
4	mit grobem Spray Sputum	Taschentuch	1 „	375 (12)	170 (7)	—	12 (6)
5	Auftropfen von Sputum mittels Pipette	Taschentuch	1 „	—	—	—	7 (20)
6	mit grobem Spray Bouillonkultur	Taschentuch	2 „	228 (15)	48 (5)	—	—
7	Auftropfen von Sputum mittels Pipette	Taschentuch	24 „	10 (8)	0 (4)	—	0 (11)
8	mit grobem Spray Sputum	Taschentuch	24 „	18 (8)	3 (3)	—	0 (9)
9	mit grobem Spray Bouillonkultur	Militärwaffenrock	1 „	465 (13)	42 (4)	66 (10)	4 (9)
10	mit dem Munde Bouillonkultur	Waffenrock	1 „	1933 (13)	172 (4)	289 (9)	26 (10)
11	mit dem Munde Bouillonkultur	Waffenrock	1 „	283 (10)	98 (6)	—	2 (4)
12	mit grobem Spray Bouillonkultur	Fußboden	1 „	—	—	13 (10)	4 (10)
13	mit grobem Spray Bouillonkultur	Fußboden	24 „	0 (10)	0 (10)*	—	—
14	mit grobem Spray Bouillonkultur	Fußboden	24 „	0 (10)	0 (10)	—	—
15	mit grobem Spray Bouillonkultur	Fußboden	24 „	—	—	39 (14)*	8 (7)*

Bemerkungen: Die in Klammern gesetzten Zahlen bedeuten die Anzahl der exponierten Platten. Expositionsdauer der Platten 24 Stunden, nur 1 bzw. 2 Stunden in den mit einem * bezeichneten Versuchen.

innerhalb der ersten 5 Minuten über 90% der Keime sich zu Boden senkten. Bei ausgesucht feinem Staub waren 30 Minuten nach der Staubaufwirbelung noch 25% der Keime in der Luft vorhanden. Meine Beobachtungen entsprechen also im wesentlichen denjenigen von *Stern*, wenn sie auch mit diesen wegen der andersartigen Versuchsanordnung nicht unmittelbar verglichen werden können.

Unter Bedingungen der Staubentwicklung, die derjenigen der Praxis entsprechen, besteht also ein *recht erheblicher Teil des Staubes aus feinstem, flugfähigem Material.*

Auch in den Fußbodenversuchen 12 und 15 erwies sich ein Teil des Staubes als schwebefähig, dieser Anteil ist aber verglichen mit der in den Taschentuch- und Waffenrockversuchen erhaltenen Ausbeute offenbar ein viel geringerer, denn während z. B. das benutzte Taschentuch rein und frei war von sichtbaren Staub, befand sich auf dem geprüften Fußboden in beiden Versuchen eine dicke Staubschicht. Man hätte in den Fußbodenversuchen eine wesentlich größere Menge schwebefähiger Keime erwarten müssen. Die Versuche bedürfen noch der Ergänzung.

Daß die Experimente, bei denen das Trocknen 24 Stunden dauerte, eine erheblich geringere Keimausbeute auch bei Exponierung der Agarplatten unmittelbar nach der Verstäubung ergaben, hängt wohl mit einer Schädigung des Prodigiosuskeime durch längeres Trocknen bzw. längere Belichtung zusammen. Die Resultate dieser Versuche haben nur beschränkten Wert.

Übertragen wir, was wohl ohne weiteres zulässig ist, die Ergebnisse der Prodiogisusversuche auf die *Verstäubung in Tröpfchen sich absetzender pathogener Keime*, so kann gesagt werden: Auch pathogene Keime, die in Sekrettröpfchen auf Taschentuch, Staubtuch, die Kleidung, den Fußboden verstreut werden, können sich *bei Einwirkung starker mechanischer Erschütterung, wie sie z. B. beim Bettenmachen, Kleiderabbürsten, trocknen Fegen des Fußbodens gegeben ist, bereits eine Stunde nach ihrer Ausstreuung von den fraglichen Objekten in Form teilweise feinsten flugfähigen Staubes ablösen und die Luft eines Zimmers auf längere Zeit hin infizieren*, vorausgesetzt, daß sie ein kurzdauerndes Trocknen aushalten, ohne geschädigt zu werden.

Mit Rücksicht auf diejenigen Infektionskrankheiten, bei denen eine Verstreuung von Tröpfchen nachgewiesenermaßen stattfindet, bzw. für welche eine derartige Verstreuung wahrscheinlich ist, wäre es nun von nicht geringem praktischen Interesse die in der Tabelle mitgeteilten Versuche noch nach 2 Richtungen hin zu ergänzen. Erstens wäre festzustellen, *zu welcher kürzesten Zeit* nach der Verstreuung auf irgendwelche Objekte die Tröpfchen sich von diesen in Form feinsten trockenen Staubes ablösen können, zweitens ob und in welchem Umfange eine Ablösung auch *schon bei kurzen und geringen Erschütterungen* stattfindet. Allerdings ist nach dem Ausfall der soeben mitgeteilten Versuche von vornherein

sehr wahrscheinlich, daß kleinste Sputumtröpfchen fast sofort nach ihrem Auffallen auf irgendeinen Gegenstand trocknen, daß sie auch sehr bald nach dem Trocknen unter gewissen Bedingungen in Staubform abgesprengt werden können, endlich auch daß bereits beim einfachen Gehen von der Kleidung, bei Hantierungen mit Decken und Tüchern von diesen Keime zur Ablösung kommen, die als feinster Staub längere Zeit in der Luft schweben. Für die Richtigkeit der letzteren Annahme sprechen besonders die schon zitierten Experimente *B. Heymanns* mit Prodigiosusaufschwemmungen, die er an Kleidung antrocknen ließ. Es kam in seinen Versuchen zu einer Ablösung der angetrockneten Keime ausschließlich durch die beim Gehen erzeugten Reibungen der Kleidungsstücke.

Über das Ergebnis der nach dieser Richtung hin eingeleiteten Versuche wird später ausführlich berichtet werden. Hier sei nur das Resultat eines Versuches mitgeteilt, das sehr stark für ein sofortiges Trocknen und die sofortige Verstäubbarkeit feinster Sputumteilchen spricht. Auf ein Taschentuch wurde eine Heubacillen-Aufschwemmung versprayt, dann das Taschentuch sofort in einem Glaskasten ausgeklopft. Auf den ausgestellten Platten waren nicht nur sofort nach der Stauberzeugung, sondern auch 15 Min. danach zahlreiche Keime nachzuweisen.

Eine *Fixierung* der Tröpfchen auf der Unterlage, wie sie *Heymann* als häufig annimmt, findet unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen nicht statt, vielmehr, wovon auch ich mich habe wiederholt überzeugen können, nur dann, wenn die Tröpfchen auf völlig glatte und staubfreie Flächen fallen, z. B. Objektträger aus Glas, Holzplatten usw. Vielleicht ist auch in meinen Fußbodenversuchen (13 und 14 der Tabelle) die Fixierung der Tröpfchen auf dem mit Linoleum belegten fast staubfreien Fußboden Ursache des negativen Resultates gewesen.

In welchem Umfange in der Praxis von solchem feinsten, von getrockneten Tröpfchen stammendem Staub *Infektionen durch Einatmen der Erreger* veranlaßt werden können, darüber geben meine Untersuchungen noch keine sichere Auskunft. Was die Verhältnisse bei der Tuberkulose betrifft — auf andere Infektionskrankheiten soll hier nicht näher eingegangen werden — so werden Infektionen in größerem Umfange durch derartigen Staub nur dann angenommen werden können, wenn die Tuberkelbacillen durch stundenlanges Trocknen *nicht geschädigt* werden und wenn die Konzentration bacillenhaltigen feinsten Staubes in der Luft eine *nicht allzu geringe ist.*

Eine Klärung dieser beiden Punkte streben die Untersuchungen des Abschnittes II und III meiner Arbeit an.

II. Absterbeordnung und Virulenz von in dünnen Sputumschichten getrockneten Tuberkelbacillen.

Die Lebensdauer der Tuberkelbacillen in getrocknetem Sputum ist mehrfach untersucht worden. Nach *Flügge* müssen wir für Tuberkelbacillen in getrockneten größeren Auswurfmassen eine Lebensdauer von mehreren Monaten annehmen. Nach demselben Autor werden die Bacillen in dünner Sputumschicht von diffusem Tageslicht nach 3 Tagen, bei Einwirkung von Sonnenlicht schon nach $1^1/_2$—3 Stunden abgetötet.

An Kleidern angetrocknete Sputumreste von Phthisikern bargen noch wochenlang nach ihrem Antrocknen reichlich lebensfähige und virulente Bacillen (*Noetel*). Nach *Kirstein* konnten Tuberkelbacillen als lebend nachgewiesen werden in mit feinsten Tröpfchen infiziertem Aktenstaub bis zu 8 Tagen, nach 14 Tagen nicht mehr, in Sputumstaub bis zu 4 Tagen, nach 7 Tagen nicht mehr, an Kleiderfasern bis zu 5 Tagen, nach 10 Tagen nicht mehr, im Straßenstaub bis zu 3 Tagen, nach 8 Tagen nicht mehr.

Die Abnahme der Infektiosität von Sputum bei längerem Trocknen wurde u. a. auch von *Kuß* und *Chaussé* näher untersucht. *Kuß* stellte fest, daß die „Virulenz" getrockneten, bacillenhaltigen Sputums bei parenteraler Verimpfung auf Meerschweinchen noch nach 14 Tagen eine gute war, nach 18 Tagen war sie etwas verringert. *Chaussé* verteilte Sputumtropfen von 70 mg auf Glasplatten derart, daß das Sputum in allen Proben eine Grundfläche von 1—2 qcm einnahm. Die Prüfung auf Infektiosität des Materials geschah nun in der Weise, daß von Zeit zu Zeit eine Probe getrockneten Sputums im Mörser zerrieben wurde unter Zusatz von Kochsalzlösung, und die so gewonnene Bacillenaufschwemmung teils gegen Meerschweinchen versprayt, teils den Tieren subcutan appliziert wurde. Vom 10. Tage ab war die Virulenz des Sputums im Inhalationsversuch erloschen, aber noch nicht für die subcutane Infektion. Bei den Inhalationsversuchen fiel *Chaussé* auf, daß die Infektiosität des Sputums ganz plötzlich aufhörte; die Wirkung der letzten noch eben von den Lungen aus infizierenden Sputumprobe war in bezug auf die zustandegekommene Erkrankung des Meerschweinchens noch eine recht starke. Die Annahme *Chaussés*, daß die Infektiosität des getrockneten Sputums in Inhalationsversuchen deswegen früher erlischt als bei subcutaner Verimpfung, weil die Inhalationsinfektion an sich eine mildere sei als die subcutane, ist durch experimentelle Erfahrungen nicht zu stützen. Es kann als sicher gelten (*Chaussé*, *B. Lange* und *Nowosselsky*), daß virulente Kulturen in kleinsten Mengen (1 bis 10 Bacillen), auch von den Lungen aus aufgenommen, in der Regel eine schwere Tuberkulose erzeugen. Die Beobachtung *Chaussés* erklärt sich ungezwungen aus der Tatsache, daß die Versprühung einer tuberkelbacillenhaltigen Flüssigkeit nur dann zu einer Inhalationsinfektion führt, wenn die Bacillen *in genügender Menge* pro Volumeneinheit der Flüssigkeit vorhanden sind; ist die Menge zu gering, so gehen die feinsten Tröpfchen des Sprays, welche allein für die Lungeninfektion in Betracht kommen, leer aus. Bei der subcutanen Infektion kommt dieses mechanische Moment nicht in Betracht.

In allen bisherigen Untersuchungen über die Lebensfähigkeit der Tuberkelbacillen in trockenem Sputum ist das quantitative Moment, also die „*Absterbeordnung*" der Tuberkelbacillen so gut wie gar nicht berücksichtigt worden, ebensowenig das Verhalten der *Virulenz*. Es liegt nun auf der Hand, daß die von einem getrockneten und verstäubten Sputum ausgehende Infektionsgefahr nicht etwa erst dann erlischt, wenn alle Bacillen abgestorben sind, *vom praktischen Gesichtspunkt aus* ist sie offenbar schon *viel früher erloschen* oder nahezu gleich Null. Dieser Zeitpunkt ist dann erreicht, wenn die Zahl lebender Bacillen in dem getrockneten Sputum stark reduziert ist, oder wenn zwar noch sehr zahlreiche lebende Bacillen in dem betreffenden Material vorhanden, aber diese avirulent geworden sind.

Es schien mir daher von Interesse, Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, *zu welcher Zeit*, vom Beginn des Trocknens an gerechnet, eine stärkere Abnahme der Zahl der Bacillen und wann eine Virulenzabschwächung derselben in getrocknetem Sputum zu erwarten ist. Da es mir vor allem darauf ankam, die Absterbebedingungen der Tuberkelbacillen unter Verhältnissen zu untersuchen, wie sie in der Praxis am häufigsten gegeben sind, habe ich die Bacillen in Kochsalzlösung oder Sputum an böhmische Granaten in *möglichst dünner Schicht* antrocknen lassen und sie in diesem Zustande teils dem diffusen Tageslicht ausgesetzt, teils im Dunkeln aufbewahrt. Auch das an Kleider, Decken usw. verschmierte Sputum, im besonderen aber die ausgehusteten Sputumtröpfchen trocknen ja an den Objekten meist in sehr dünner Schicht an und sind bald dem Tageslicht ausgesetzt, bald — wie in Falten der Kleidung — diesem längere Zeit entzogen. Im einzelnen war meine Versuchsanordnung folgende:

In eine Aufschwemmung von Tuberkelbacillen wurden sterile und wie zu Desinfektionsversuchen vorher gereinigte böhmische Granaten von möglichst gleicher Größe und glatter Oberfläche hineingelegt und durch Schütteln für eine gleichmäßige Benetzung der Granaten mit der Aufschwemmung gesorgt. In einer ersten Versuchsreihe bediente ich mich einer Aufschwemmung humaner Tuberkelbacillen in Kochsalzlösung (1 mg pro 1 ccm), in einer zweiten einer Verreibung von Tuberkelbacillen in Phthisikersputum (die gleiche Bacillenmenge pro 1 ccm). Mikroskopische Präparate von den Aufschwemmungen ergaben, daß die Bacillen gleichmäßig verteilt waren, nur selten lagen sie in kleinen Häufchen zu 3—5 zusammen. Nach 30 Min. wurden die Granaten mit einem Spatel herausgenommen und in Gruppen zu 5 auf sterile, gut trockene Petrischalen verteilt. Mehrere Gruppen der Granaten wurden nun von der Petrischale auf weitere Petrischalen übertragen, so lange, bis von den Granaten Flüssigkeit an den Boden der Glasschalen nicht mehr abgegeben wurde, was nach 6 maligem Wechsel der Glasschalen erreicht war. Zu dieser Zeit war auch an den Granaten Feuchtigkeit nicht mehr sichtbar. Jetzt wurden die Gruppen geteilt, die 1. als Kontrolle sogleich, die beiden nächsten 2 Stunden, 2 weitere 24 Stunden usw. nach dem Moment des beginnenden Antrocknens in Reagensgläser mit Kochsalzlösung verbracht (auf 5 Granaten 2 ccm) und durch 5 Minuten langes Schütteln eine möglichst vollkommene Absprengung der an die Granaten angetrockneten Bacillen angestrebt. Vorversuche mit Prodigiosuskeime hatten ergeben, daß bei der oben beschriebenen Versuchsanordnung an 5 Granaten fast regelmäßig $^1/_{1000}$ der pro Kubikzentimeter enthaltenen Keime antrocknet bzw. später zur Ablösung gebracht wird. Die verschiedenen Proben wurden teils dem diffusen Tageslicht ausgesetzt, teils blieben sie in einem Schrank verschlossen.

Mit der Granatenwaschflüssigkeit wurden nun Meerschweinchen in abgestuften Mengen, z. B. $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{10\,000}$ und $^1/_{100\,000}$, subcutan geimpft. Leider starb ein Teil der geimpften Tiere so frühzeitig an einer Stallseuche, daß eine Diagnose nicht möglich war, denn in solchen Fällen führte meist auch die Weiterverimpfung verdächtigen Materials auf gesunde Tiere wegen der Mitübertragung der Seuchenerreger nicht zum Ziel. Die lebenden Tiere wurden von Zeit zu Zeit untersucht, im besonderen auf den Zeitpunkt des Auftretens der Drüsenschwellung geachtet. Nach 3 Wochen wurde die 1., nach 5 Wochen in der Regel die 2. Tuberkulinintracutanprüfung vorgenommen.

Die Ergebnisse der Verimpfungen sind aus der Tab. 2 zu ersehen. In der Tab. 3 sind die für die Wirksamkeit der Waschflüssigkeit erhaltenen Grenzwerte in Form von Kurven zusammengestellt.

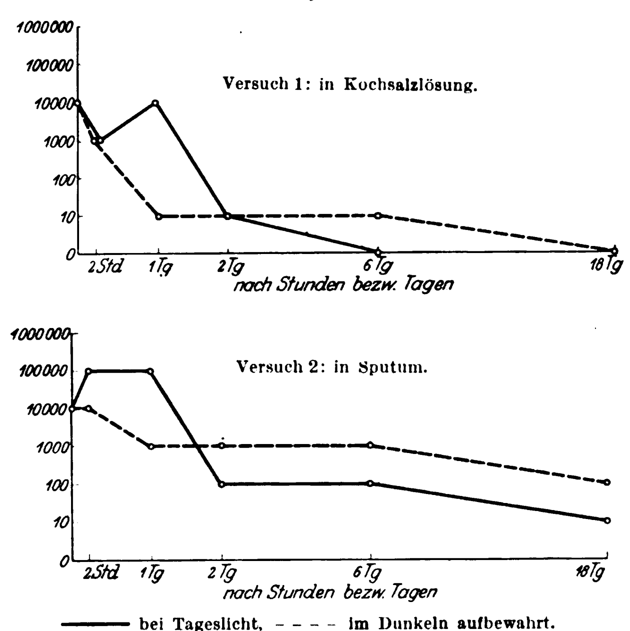
Tabelle 2. *Ergebnis der Tierimpfung mit Verdünnungen des Granatenwaschwassers.*

	Kontrolle (Verimpfung sofort)	Aufbewahrung	nach 2 Stunden	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	nach 6 Tagen	nach 18 Tagen
I	1/100 †75 +	im Tageslicht	1/100 †90 +	1/10 ×48 +	1/10 †52 +	1/10 †53 0	1/10 †112 0
	1/1000 †10 ?		1/1000 †130 +	1/100 †129 +	1/100 ×180 0	1/100 ×175 0	1/100 ×150 0
	1/10000 ×90 +		1/10000 †114 0	1/1000 †14 ?	1/1000 †130 0	1/1000 ×175 0	
	1/100000 ×90 0		1/100000 †100 0	1/10000 ×180 +	1/10000 †28 ?	1/10000 †84 0	
				1/100000 †5 ?	1/100000 †52 0	1/100000 ×175 0	
		im Dunkeln	1/100 †30 +	1/10 †75 +	1/10 †60 +	1/10 †36 +	1/10 ×150 0
			1/1000 †130 +	1/100 †64 0	1/100 †162 0	1/100 ×175 0	
			1/10000 †130 0	1/1000 †180 0	1/1000 ×178 0	1/1000 ×120 0	
			1/100000 †14 ?	1/10000 †130 0	1/10000 †30 ?	1/10000 ×175 0	
				1/100000 †66 0	1/100000 †74 0	1/100000 ×175 0	
II	1/100 †74 +	im Tageslicht	1/100 †55 +	1/10 †32 +	1/2 †40 +	1/2 †7 ?	1/2 †62 +
	1/1000 †20 +		1/1000 †65 +	1/100 †50 +	1/10 †30 +	1/10 ×85 +	1/10 ×98 +
	1/10000 †74 +		1/10000 ×120 +	1/1000 ×120 +	1/100 ×90 +	1/100 ×115 +	1/100 †35 0
	1/100000 †30 ?		1/100000 †77 +	1/10000 †52 0	1/1000 ×109 0	1/1000 †50 0	1/1000 ×93 0
	1/1000000 ×120 0		1/1000000 †27 ?	1/100000 ×90 +	1/10000 ×108 0	1/10000 †83 0	1/10000 ×08 0
		im Dunkeln	1/100 †65 +	1/10 ×90 +	1/2 †42 +	1/2 ×118 +	1/2 †60 +
			1/1000 †60 +	1/100 †30 +	1/10 †30 +	1/10 †41 +	1/10 †87 +
			1/10000 ×90 +	1/1000 †33 +	1/100 †70 +	1/100 †71 +	1/100 †83 +
			1/100000 ×120 0	1/10000 †45 0	1/1000 ×90 +	1/1000 †83 +	1/1000 ×98 0
			1/1000000 †33 ?	1/100000 †45 0	1/10000 †28 ?	1/10000 †? ?	1/10000 ×98 0

†30 = gestorben nach 30 Tagen. + = Tuberkulose.
× = getötet. 0 = keine Tuberkulose.

Tabelle 3.

Absterbeordnung der Tuberkelbacillen, angetrocknet an Granaten in dünner Schicht.



Wie wir sehen, sind von 10000 lebenden virulenten Tuberkelbacillen in der ersten Versuchsreihe noch lebensfähig nach zweistündigem Trocknen bei Tageslicht 1000 = $^1/_{10}$, im Dunkeln 1000 = $^1/_{10}$, nach 1 Tag bei Belichtung 10000, also sämtliche Keime, im Dunkeln nur 10 = $^1/_{1000}$, nach 2 Tagen in beiden Gruppen 10 = $^1/_{1000}$, nach 6 Tagen 0 bzw. 10 = $^1/_{1000}$ der Ausgangsmenge. Nach 18 Tagen waren lebende virulente Bacillen nicht mehr nachweisbar. In der zweiten Versuchsreihe, bei der die Bacillen in Sputum aufgeschwemmt waren, erfolgte das Absterben deutlich langsamer. Merkwürdigerweise sind auch hier wieder zunächst die belichteten Bacillen im Vorteil, später gegenüber den im Dunkeln gehaltenen im Nachteil. Nach einer anfänglichen Verminderung auf 10% hält sich die Zahl lebensfähiger Bacillen tagelang auf gleicher Höhe. Sogar nach 18 Tagen sind noch 1% der Keime lebensfähig. Die Verimpfung der dem Licht ausgesetzten Proben ergab ein starkes Absinken der Keimzahl nach 2 Tagen. Von da ab fällt die Kurve sehr langsam, nach 18 Tagen sind noch 1‰ der Keime lebensfähig.

Was die Virulenz der verimpften Bacillen betrifft, so kann ich mir ersparen, auf Einzelheiten näher einzugehen. Die Drüsenschwellungen traten bei den Tieren gewöhnlich nach 3 bis 4 Wochen auf, zu dieser Zeit war meist auch die Tuberkulinreaktion schon positiv oder doch

angedeutet positiv (++ und + nach *Römer*). Der Sektionsbefund der Tiere, welche vielfach infolge ihrer Tuberkulose starben — wenn auch der kleinen verimpften Bacillenmenge entsprechend gewöhnlich nach $2^1/_2$—4 Monaten — ergab so ausgesprochene spezifische Veränderungen, daß von einer Abschwächung der Infektion nicht die Rede sein konnte. Besonders sei darauf hingewiesen, daß die Meerschweinchen der 18 Tage im Dunkeln aufbewahrten Proben (Serie II) sämtlich nach 60 bzw. 87 bzw. 83 Tagen *mit Zeichen schwerer allgemeiner Tuberkulose verendeten.*

Die Zahl der Versuche ist zu gering, um zu einem endgültigen Urteil zu gelangen.

Beide Versuchsreihen stimmen aber gut miteinander überein und entsprechen auch recht gut den Erfahrungen, die sonst über den Gegenstand vorliegen. Kleine Unregelmäßigkeiten, die sich bei der gewählten Versuchsanordnung niemals ganz vermeiden lassen, fallen, wie ich glaube, nicht ins Gewicht. Bei dem Ergebnis der Versuchsreihe 1 ist zu berücksichtigen, daß hier die Tuberkelbacillen unter *denkbar ungünstigen* Bedingungen dem Trocknen ausgesetzt waren. Für die Praxis ist allein die Versuchsreihe 2 maßgebend.

Soviel glaube ich aus den Experimenten schließen zu dürfen: Selbst in feinster Sputumschicht kommt es *mindestens nicht in den ersten Stunden nach dem Trocknen zu einem irgendwie beachtenswertem Absterben der Tuberkelbacillen,* eine Keimverminderung setzt wahrscheinlich erst vom zweiten Tage ab ein, sie scheint aber auch dann noch nicht sehr beträchtlich zu sein. *Anhaltspunkte dafür, daß die getrockneten Bacillen in ihrer Virulenz abgeschwächt sind, haben sich nicht ergeben.*

Für die Beurteilung der Verhältnisse in der Praxis scheint mir wesentlich zu sein, daß eine Suspendierung von Bacillen in so dünner Sputumschicht, wie ich sie im Experiment angewandt habe, in der Hauptsache für die *in Tröpfchen verstreuten Bacillen* zutrifft, vielleicht auch noch hier und da für Sputumreste, die beim Abwischen des Mundes mit dem Taschentuch an diesem oder beim Einstecken des Taschentuches in die Tasche an dem Tascheneingang hängen bleiben, daß aber sehr häufig z. B. an der Kleidung, an Decken, am Taschentuch Sputum *auch in dickerer Schicht* verschmiert wird, wobei die Bacillen einer geringeren Schädigung unterliegen als in meinen Versuchen: Unter diesen Bedingungen dürfte eine ins Gewicht fallende Verminderung der lebenden Bacillen *erst zu späterer Zeit* zu erwarten sein. Daß dem in der Tat so ist, haben Experimente *Chaussés* gezeigt, der mit dem Sputumstaub von Taschentüchern *noch nach zehntägigem* Trocknen bei Zimmertemperatur und Tageslicht 7 dem Staub exponierte Meerschweinchen sämtlich von den Lungen aus infizieren konnte.

III. Versuche, Meerschweinchen durch Einatmung bacillenhaltigen Sputumstaubes von den Lungen aus zu infizieren. Sputum in Tröpfchen an verschiedenen Objekten angetrocknet.

An anderer Stelle ist darauf hingewiesen worden, daß frühere Inhalationsexperimente an Meerschweinchen mit trockenem Sputumstaub deswegen mißlungen sind, weil das Trocknen des Sputums unter unnatürlichen, die Bacillen schädigenden Bedingungen erfolgte. *Cornet* gelang der Nachweis, daß bei einer Versuchsanordnung, die sich den natürlichen Verhältnissen besser anpaßt, Meerschweinchen durch Einatmung angetrockneten und verstäubten phthisischen Auswurfs sich mit größter Leichtigkeit infizieren lassen. *Cornet* verunreinigte einen Teppich durch bacillenhaltiges Sputum, ließ dieses natürlich antrocknen und fegte den Teppich dann wiederholt mit scharfem Besen, so daß sich immer von neuem Wolken von Staub erhoben. Von 36 in verschiedener Höhe diesem Staub in einem Zimmer exponierten Meerschweinchen erkrankten 35 an Tuberkulose. Die hochgradige Schwellung und Verkäsung der Trachealdrüsen bei den Tieren deutet auf primäre Lungeninfektion infolge Einatmung feinsten flugfähigen Staubes hin. *Kuß* hatte mit ähnlicher Versuchsanordnung den gleichen starken Erfolg. Auch *Köhlisch* gelang auf diese Weise die Infektion bei 15 von 17 seiner Tiere (ein negatives Tier fällt für die Beurteilung aus, da es vorzeitig einging). Die positiven Tiere erwarben eine typische primäre Lungeninfektion.

Sticher und *Beninde* experimentierten mit an leinenen Stoffen angetrocknetem Sputum. Als *Sticher* Sputum an Leinwandläppchen den natürlichen Verhältnissen entsprechend antrocknete, die Läppchen in einem Beutel stark aneinanderrieb, den entstehenden Staub mit stärkeren Luftstrom ansaugte und Meerschweinchen in konzentrierter Form zuführte, konnte er bei 7 von 8 exponierten Tieren typische primäre Lungentuberkulose erzeugen. Seine weiteren Versuche mit schwachen Luftströmungen sind wohl deshalb negativ ausgefallen, weil er das Sputum an den Läppchen *tagelang im Exsikkator* trocknete. Dabei ist offenbar ein großer Teil der Bacillen abgestorben.

Beninde hatte mit sputumbeschmutzten Taschentüchern nur dann positive Resultate, wenn die Beschmutzung eine geringe war und die Taschentücher von den betreffenden Kranken 1—2 Tage unbenutzt in der Tasche getragen wurden.

Am eingehendsten hat sich in neuerer Zeit *Chaussé* mit Sputumstaubinhalationsversuchen beschäftigt. *Chaussé* infizierte wollene Kleidungsstücke mit geringen Sputummengen eines Phthisikers und bürstete zu verschieden langer Zeit nach dem Trocknen die Kleider mit gewöhnlicher Kleiderbürste in einem 126 Liter fassenden Kasten ab. In dem Kasten befanden sich Meerschweinchen. In anderen Versuchsreihen wurden Wäschestücke (auch Taschentücher) entweder künstlich mit

wenigen Tropfen bacillenhaltigen Sputums infiziert oder auch Kranken zur Benutzung übergeben, dann getrocknet und in dem gleichen Behältnis durch einen besonders konstruierten Apparat vor Meerschweinchen stark geschüttelt. Das Trocknen des Sputums erfolgte durchweg bei Zimmertemperatur und, abgesehen von den Versuchen mit Taschentüchern der Kranken, die *zusammengerollt* aufbewahrt wurden, unter der Einwirkung des diffusen Tageslichts.Die Ergebnisse der *Chausséschen* Versuche waren folgende: Wurden Kleidungsstücke 2—4 Tage getrocknet, so *konnte bei sämtlichen dem Staube exponierten Tieren eine primäre Lungentuberkulose erzeugt werden.* Bei längerem Trocknen (6—13 Tage) ging die Zahl der positiven Tiere auf 50% der exponierten zurück. Auch noch bei 16tägigem Trocknen wurde 1 Tier von 5 exponierten infiziert. In 5 Versuchen mit künstlich beschmutzten Leinentüchern, welche 2—10 Tage getrocknet waren, wurden sämtliche 30 exponierten Tiere tuberkulös. Bei natürlicher Beschmutzung ergab sich nach der Zeit der Trocknung folgendes Resultat:

Tabelle 4.
Chaussés Versuche mit von Phthisikern gebrauchten Taschentüchern.

Dauer des Trocknens in Tagen	Zahl der Versuche	Zahl der exponierten Tiere	Davon infiziert (primäre Lungeninfektion)
1	4	27	15
2 bzw. $2^1/_2$	3	18	16
4 bzw. $4^1/_2$	2	15	13
5	1	10	0
6	2	15	6
zusammen:	12	85	50 = ca. 60%

Die Versuchsbedingungen in den oben erläuterten Experimenten sind gewiß, darin muß man *Flügge* beipflichten, vielfach stark übertrieben. Die Verunreinigung der Objekte mit Tuberkelbacillen war fast durchweg eine erhebliche, die Ablösung des Staubes geschah durch fortgesetzte starke mechanische Einwirkungen und zum Teil unter Zuhilfenahme starker Luftströme, in den Versuchen von *Sticher* und *Beninde* wurde außerdem die staubhaltige Luft den Versuchstieren in konzentriertem Zustande zugeleitet. Andererseits muß aber bedacht werden, daß bei dem sehr geringen Atemvolumen des Meerschweinchens im Vergleich zum Menschen und der sehr kurzen Expositionszeit der Tiere eine Übertreibung in solchen Experimenten nach anderer Richtung hin *notwendig* wird, um hier einen Ausgleich zu schaffen. Berücksichtigen wir dies, vor allem aber den *sehr starken Erfolg* dieser Experimente, so kann meiner Überzeugung nach kaum zweifelhaft sein, *daß das Antrocknen und die Verstäubung von Sputum an Kleidern, Taschentüchern*

und Teppichen eine hohe Infektionsgefahr darstellt. Diese Infektionsgefahr wird naturgemäß unter sonst gleichen Bedingungen dort am größten sein, wo in engen Wohnräumen eine Staubaufwirbelung von infizierten Objekten sich stets von neuem wiederholt. Daß die Anschauung *Flügges*, eine derartige Stauberzeugung geschehe in der Praxis selten, sich nicht aufrecht erhalten läßt, habe ich an früherer Stelle bereits ausgeführt.

Meine eigenen Untersuchungen gliedern sich in 4 Abschnitte.

1. Spontaninfektionen von Meerschweinchen durch am Fell angetrocknetes Sputum.

Zunächst habe ich geprüft, *inwieweit in dünner Schicht am Fell von Meerschweinchen angetrocknetes Sputum zu Spontaninfektionen der Tiere* Veranlassung geben kann.

Mehreren Meerschweinchen wurde mittels Platinöse Sputum von Phthisikern auf das Fell gestrichen, und zwar in so geringer Menge, daß das Sputum bereits nach 5—10 Minuten völlig angetrocknet war. Die Tiere wurden dann in den Versuchen 1, 3 und 4 in die im Institut verwendeten geräumigen Drahtkäfige hineingesetzt, im Versuch 2 in eine enge Holzkiste, deren Deckel lediglich zu den Zeiten der Fütterung der Tiere geöffnet wurde. Während die Meerschweinchen der Versuche 1—3 einige Tage nach der Verunreinigung ihres Fells reichlich trockenes Heu erhielten, bekamen die Tiere des Versuches 4 nur frisches Gras. Das Sputum stammte jedesmal von einem anderen Kranken des Rudolf-Virchow-Krankenhauses und enthielt mäßig reichlich bis reichlich Bacillen.

Tabelle 5.
Spontaninfektionen von Meerschweinchen durch am Fell getrocknetes Sputum.

Versuch Nr.	Bacillen im Sputum	Besondere Maßnahmen	Behältnis*, in dem die Tiere untergebracht waren	Zahl der exponierten Tiere	Davon infiziert	primäre Lungeninfektion	Infektion v. Nasenrachenraum	Negativ
I	+++	Nach der Beschmutzung mit Sputum wurde den Tieren an 3 Tagen hintereinander reichlich trockenes Heu gegeben.	Drahtkäfig	4	3	2	1	1
II	+++	Desgleichen	Holzkiste 50 : 30 : 20 cm	6	2	1	1	4
III	++	Nur an 2 Tagen Heu	Drahtkäfig	4	1	0	1	3
IV	+++	Fütterung mit frischem Gras	Drahtkäfig	5	0	0	0	5

* Sämtliche Tiere eines Versuchs saßen in demselben Behältnis.

Der vierte Versuch, in dem offenbar wegen der Feuchtigkeit des die Tiere umgebenden Milieus eine Verstäubung des Auswurfs unterblieb,

fiel ganz negativ aus. In den drei anderen Versuchen wurden 6 von 14 Tieren infiziert, und zwar — nach dem Sektionsbefund — dreimal vom Nasenrachenraum, dreimal von den Lungen aus. Eine primäre Lungeninfektion wurde also in 20% der Fälle beobachtet.

Berücksichtigen wir, daß die Beschmutzung des Fells der Tiere nur ein einziges Mal stattfand, und die Tiere im Versuch I in einem Käfig saßen, durch den ständig die Luft des großen Stallraumes zirkulierte, feinste im Käfig entstehende Staubteilchen aus dem Atembereich der Tiere fortführend, müssen wir den *Erfolg der Versuche als beträchtlich* bezeichnen.

Auf die natürliche Infektion *des Menschen* kann aus den Experimenten nicht ohne weiteres ein Schluß gezogen werden, da in ihnen offenbar das trockene und leicht verstäubende Heu als Träger der Sputumbacillen und Staubquelle neben dem Fell der Tiere eine wichtige Rolle spielt. Wir dürfen aber schließen auf die in *Tierstallungen* gegebenen Verhältnisse, sofern durch kranke Tiere eine Ausstreuung von Tuberkelbacillen z. B. im Sputumtröpfchen auf Trockenfutter stattfindet. Hier müssen die an Heu oder Stroh angetrockneten Sputumreste immer von neuem mit dem feinen Futterstaub in die Luft übergehen, dabei werden sie von gesunden Tieren leicht in die Lungen eingeatmet werden können. In meinen Versuchen hat die Ansteckung durch Inhalation trockenen Sputumstaubes bzw. durch Kontakte stattgefunden, eine Ansteckung durch Hustenstöße kommt hier überhaupt nicht in Betracht. So scheint mir nichts dagegen zu sprechen, daß ähnlich wie beim Menschen *auch bei Rindern* die Verbreitung der Tuberkulose hauptsächlich durch Bacillen in trocknem Staub geschieht, allenfalls noch durch Kontakte. Selbst aus der offenbar nicht zutreffenden Annahme, daß die Staubinfektion die *einzig mögliche* Übertragungsweise der Tuberkulose bei Rindern ist, würde sich die hohe Kontagiosität der Tuberkulose in Rinderstallungen befriedigend erklären lassen.

Es soll noch auf eine Schlußfolgerung aus den Experimenten der Tabelle 5 hingewiesen werden, die sich auf das Tierexperiment mit Hustentröpfchen bezieht.

Nach dem Ausfall meiner Versuche unterliegt es wohl keinem Zweifel, daß Versuche, Meerschweinchen durch Anhusten von Phthisikern zu infizieren, für die Beurteilung des hierbei wirksamen Infektionsmodus nur dann einen Wert haben, *wenn durch besondere Vorsichtsmaßnahmen eine bleibende Beschmutzung des Fells der Tiere dabei vermieden wird*. Es scheint mir zweifelhaft, ob diese Fehlerquelle bei Experimenten der genannten Art immer hinreichend beachtet worden ist.

B. Heymann macht auf sie aufmerksam. *Hippke* erwähnt sie nicht, trotzdem er ausdrücklich auf andere Fehlerquellen und ihre Vermeidung hinweist. Bei *Chaussé* findet sich ebenfalls keine Bemerkung dar-

über. In welchem Umfange diese Fehlerquelle — etwa bei den Versuchen *Chaussés* — eine Rolle spielt, ist natürlich nicht annähernd abzuschätzen.

2. Abbürsten eines mit Auswurf verunreinigten Wolltuches.

Die Ergebnisse meiner Prodigiosus-Experimente veranlaßten mich, in einem weiteren Versuch zu ermitteln, ob auf ein wollenes Tuch verschmiertes Sputum *bereits nach 1 Stunde* soweit getrocknet ist, daß es, unter geeigneten Bedingungen sich als Staub ablösend, Meerschweinchen auf dem Inhalationswege zu infizieren imstande ist.

Ein mit Sputum von mittlerem Bacillengehalt *in sehr dünner Schicht* bestrichenes wollenes, ziemlich verstaubtes Tuch wurde 1 Stunde zum Trocknen auf den Tisch eines Laboratoriumzimmers gelegt und dann mit einer Kleiderbürste in einem $58 \times 59 \times 72$ cm großen Glaskasten mehrmals abgebürstet. 4 Meerschweinchen, die, in Blechhülsen fixiert, auf einem 10 cm hohen Holzgestell im Kasten aufgestellt waren, wurden trotz der nur kurzen Exposition von 2 Stunden sämtlich infiziert. Bei den 5 Wochen nach der Infektion getöteten Tieren fand sich durchweg ein typischer primärer Komplex, primärer Lungenherd und hochgradige Verkäsung der zugehörigen Trachealdrüse.

3. Tröpfchenverstreuung auf wollene Tücher. Klopfen und Bürsten der Tücher.

Es ist nun die Frage von Bedeutung, in welchem Umfange Staubinfektionen *auch von bacillenhaltigen Sputumtröpfchen* ausgehen können. Wenn hierüber auch in erster Linie Meerschweinchenversuche Aufschluß geben würden, bei denen die Stauberzeugung von Gegenständen stattfindet, *die in natürlicher Weise von Phthisikern behustet* worden sind, so glaubte ich doch, um schneller zu einem Resultat zu kommen, von derartigen sehr zeitraubenden Versuchen Abstand nehmen zu können. Denn angesichts der großen Differenzen in der Ausbeute von bacillenhaltigen Hustentröpfchen bei verschiedenen Kranken und bei dem gleichen Kranken zu verschiedenen Zeiten ist bei Benutzung natürlich behusteter Objekte eine Chance zu positivem Ergebnis nur dann gegeben, wenn wir auch in anderer Beziehung die natürlichen Verhältnisse nachahmen und Meerschweinchen dem Staub solcher Objekte nicht einmal, sondern *zu sehr oft wiederholten Malen*, z. B. 100 oder 1000 mal, exponieren. Negative derartige Experimente, wie die kürzlich von *Jellenigg* mitgeteilten, besagen daher gar nichts, zumal wenn, wie in den *Jellenigg*schen Versuchen, die Versuchsanordnung noch so gewählt wird, daß beim Abstäuben der behusteten Tücher infolge der entstehenden starken Luftbewegung die sich bildenden feinsten Stäubchen sehr schnell aus dem Atembereich der Tiere herausgerissen werden.

Aus den angegebenen Gründen habe ich von Versuchen mit Hustentröpfchen abgesehen und mich darauf beschränkt, auf wollene Tücher mittels künstlichen Sprays bacillenhaltige Tröpfchen eines beliebigen Phthisikersputums zu verstreuen. Nachdem die Tröpfchen angetrocknet waren, wurden die wollenen, ziemlich staubigen Tücher mit einem dünnen Stock in dem beschriebenen Glaskasten $^1/_2$ Minute lang ausgeklopft oder mit einer Bürste abgebürstet (Versuch 3 und 6). Es entstand dabei stets sichtbarer Staub in mäßiger Menge. Nach den Prodigiosusversuchen möchte ich annehmen, daß bei Verwendung nahezu *staubfreier* Tücher die Bedingungen für eine Ablösung *feinsten* bacillenhaltigen Staubes günstiger liegen. Versuche nach dieser Richtung hin sind im Gange. Der in den Versuchen 1—5 der Tabelle 6 benutzte Spray lieferte hauptsächlich feinste Tröpfchen von 4—10 μ Durchmesser; die dem groben Spray in den Versuchen 6—10 produzierten Tröpfchen entsprachen, wovon ich mich wiederholt überzeugt habe, nach Größe und Form den natürlichen Hustentröpfchen, nur der Bacillengehalt der Tröpfchen war größer als wir ihn gewöhnlich in Hustentröpfchen antreffen. Vor dem Versuch wurde das Sputum mit Glasperlen geschüttelt und 1 : 1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Technische Einzelheiten der Experimente, wie Art der Unterbringung der Tiere im Glaskasten, Dauer des Trocknens der Wolltücher und ihre Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6.

Infektion von Meerschweinchen durch Verstäubung von getrockneten Sputumtröpfchen im Glaskasten. Tröpfchen an wollenen Tüchern angetrocknet. Tücher ausgeklopft.

Versuch Nr.	Bacillen im Sputum	Beschaffenheit der Tröpfchen	Art der Unterbringung der Tiere im Glaskasten	Wie lange nach d. Verunreinigung d. Tücher erfolgte d. Ausklopfen ders.	Zahl der exponierten Tiere	Davon erwarben prim. Lungeninf.	Negativ	Bemerkungen
I	+	sehr fein	Tiere frei am Boden sitzend	24 St.	2	0	2	
II	+	sehr fein	desgleichen	24 St.	4	0	4	1 Tier starb vorzeitig an Pneumonie
III	+++	sehr fein	desgleichen	24 St.	4	1	2	
IV	+++	sehr fein	Tiere in Blechhülsen fixiert	24 St.	4	4	0	
V	++	sehr fein	desgleichen	3 Tage	4	0	4	
VI	++	Größe von Hustentröpfchen	Tiere frei	24 St.	4	1	3	1 Tier starb vorzeitig an Pneumonie
VII	+	desgleichen	Tiere frei	24 St.	4	0	3	
VIII	++	desgleichen	Tiere frei	24 St.	4	0	4	
IX	+++	desgleichen	Tiere fixiert	24 St.	4	1	3	
X	++	desgleichen	desgleichen	$1^1/_2$ St.	4	2	2	
				Summa:	38	9	27	2 vorzeit. †

Aus den Versuchen ergibt sich folgendes: Bei geringem Gehalt von Tuberkelbacillen im Sputum (Versuch 1, 2 und 7) ist bei *keinem* der Tiere eine Infektion eingetreten, bei mittlerem Bacillengehalt (Versuch 5, 6, 8 und 10) sind 3 von 16 Tieren erkrankt, also etwa $^1/_5 = 20\%$. In den drei Versuchen mit hohem Bacillengehalt des Sputums wurden 6 von 11 exponierten Meerschweinchen positiv, also etwas über die Hälfte. Wir ersehen daraus, in wie hohem Maße die Infektionsgefahr von der Anzahl der Bacillen im Sputum abhängt. Vergleichen wir die Versuche mit feinen Tröpfchen mit den Experimenten, bei denen ein grober Spray benutzt wurde, so ist der Erfolg der ersten Versuchsreihe etwas stärker als der der zweiten (17 : 5 und 19 : 4). Daß ein Fixieren der Tiere im Drahtkäfig die Ergebnisse verbessert, ist wohl leicht verständlich. Die freisitzenden Tiere hatten die Möglichkeit zusammenzukriechen und ihren Kopf zu verstecken. Dabei mußten feinste in der Luft suspendierte Stäubchen sich dem Atembereich der Tiere entziehen.

Zählen wir alle Versuche zusammen, so wurden von 36 Meerschweinchen — 2 scheiden für die Beurteilung aus — 9, also 25% primär von den Lungen aus infiziert. Dieser Prozentsatz erscheint beträchtlich, wenn wir bedenken, daß Versuche mitgezählt wurden, bei denen von vornherein kaum an einen positiven Ausfall zu denken war (Versuch 1, 2 und 7).

Erscheint einerseits das Ergebnis der Tröpfchenexperimente, verglichen mit den oben besprochenen Sputumversuchen, für eine geringere Infektionsgefahr der angetrockneten und verstäubten Tröpfchen zu sprechen, so ist andererseits doch eine *deutliche Überlegenheit* dieser Infektionsweise vorhanden. Diese Überlegenheit, welche natürlich in gleicher Weise Hustentröpfchen und in ganz feiner Schicht verschmiertem Sputum zukommt, besteht darin, daß kleinste Sputumteilchen *sehr schnell trocknen* und daher auch *sehr bald nach ihrer Verstreuung*, z. B. auf die Kleidung, auf Betten, Decken usw., von diesen Objekten in Form feinsten *flugfähigen Staubes abgelöst werden können*, während jede gröbere Verunreinigung erst nach Stunden bzw. Tagen soweit trocknet, daß eine Ablösung in Staubform möglich ist. In dieser Beziehung sind die Ergebnisse der im ersten Abschnitt mitgeteilten Prodigiosus- und Heubacillenversuche von großem Interesse, ebenso der in diesem Abschnitt mitgeteilte Inhalationsversuch mit in dünnster Schicht natürlich getrocknetem Sputum und der Versuch 10 der Tabelle 6. In den beiden letztgenannten Versuchen mit Tuberkelbacillen hat das Trocknen immerhin noch $1-1^1/_2$ Stunden gedauert, die Grenze ist aber nicht erreicht; nach Heubacillen- bzw. Prodigiosusversuchen, deren Resultate teilweise erst nach Abschluß der Inhalationsexperimente vorlagen, muß angenommen werden, daß *auch tuberkelbacillenhaltige Sputumtröpfchen beinahe sofort nach ihrer Ausstreuung antrocknen und sich dann schon gelegentlich in feinsten Staub verwandeln können.*

4. Tröpfchenverstreuung auf ein bestäubtes Holzbrett. Abstäuben des Brettes mittels Staubtuch.

Um festzustellen, wie die Dinge liegen, wenn Sputumtröpfchen *auf einen stark verstaubten Fußboden* fallen, habe ich folgenden Versuch ausgeführt: Ein glattes Holzbrett wurde mit einer geringen Menge ausgesucht feinen Staubes (Gemisch von Kohle und Talkum) bestreut, dann in gröberen Tröpfchen mit einem Sputum bespritzt, das nur in geringer Menge Tuberkelbacillen enthielt. Nach 24 Stunden wurde in dem oben bezeichneten Glaskasten das Brett mit Staubtuch abgewischt. Von 4 im Kasten sitzenden Tieren erkrankten 3 an primärer Lungentuberkulose, das vierte mit Tuberkulose der tiefen Cervicaldrüsen.

Der starke Erfolg dieses Versuches ist wohl wesentlich durch die besondere Feinheit des Staubes bedingt, ein zweiter mit Zimmerstaub sonst in gleicher Art (mit dem Sputum desselben Patienten) angestellten Versuch hatte einen geringeren Erfolg. Von 4 exponierten Meerschweinchen *erkrankten aber auch noch 2.* Beide Tiere zeigten einen primären Lungenherd und hochgradige Verkäsung der zugehörigen Trachealdrüsen.

Wir sehen, auch *Tröpfchen mit nur wenigen Bacillen* können gefährlich werden, wenn sie auf feinen Staub treffen und dieser später aufgewirbelt wird. Ob gerade der Staub *auf dem Fußboden* öfter von so feiner Beschaffenheit ist, erscheint nach den oben mitgeteilten Prodigiosusversuchen allerdings zweifelhaft.

5. Die pathologisch-anatomischen Befunde bei den infizierten Meerschweinchen.

Von einer ausführlichen Mitteilung der Sektionsbefunde glaube ich absehen zu können. Dagegen scheint mir eine Mitteilung der sich auf die *primäre Lungeninfektion* zahlreicher Tiere beziehenden Angaben von Interesse, ich habe daher diese Angaben in der nachfolgenden Tabelle 7 nach den Versuchen geordnet zusammengestellt.

Aus dem Inhalt der Tabelle scheinen mir zwei Tatsachen besonders wichtig zu sein.

1. Von 21 mit bacillenhaltigem Staub von den Lungen aus infizierten Tieren wiesen 18 nur *einen* primären Lungenherd auf, 2 Tiere je *zwei*, bei einem weiteren war wegen der fortgeschrittenen Organtuberkulose der primäre Herd mit Deutlichkeit nicht mehr nachzuweisen.

Wie auch *Chaussé* hervorgehoben hat, entspricht der Erfolg, der in dieser Hinsicht bei den Staubinfektionsversuchen mit großer Regelmäßigkeit erzielt wird, sofern man nur *natürliche Versuchsbedingungen* anwendet, vollkommen dem, was wir beim Menschen finden. Auch beim Menschen wird ja als Folge der primären pulmonalen Infektion in der Regel *ein* Lungenherd gefunden.

Tabelle 7. *Zahl und Sitz der primären Lungenherde bei den Meerschweinchen mit typischer primärer Lungeninfektion aus sämtlichen Versuchsreihen.*

Versuche	Nr. der Versuche	Wieviel Wochen nach d. Infektion getötet?	WelcheTrachealdrüsen stark verkäst?	Zahl der primären Lungenherde	Sitz der primären Lungenherde
Tabelle 5	I	4	r.	1	r. Unterl.
	I	8	beide	1	l. Unterl.
	II	6	beide	1	r. Unterl.
Sputum an Wolltuch angetrocknet.	I	5	r.	1	r. Mittell.
	I	5	r.	1	r. Unterl.
	I	5	l.	1	l. Unterl.
Siehe S. 18	I	5	r.	1	r. Unterl.
Tabelle 6	III	8	beide	1	r. Unterl.
	IV	15	r.	1 (Kav.)	r. Unterl.
	IV	15	l.	? *	
	IV	15	beide	2	l. Unterl. r. Mittell.
	IV	15	l.	2 (2 Kav.)	l. Oberl.
	VI	10	r.	1	r. Unterl.
	IX	8	r.	1	r. Unterl.
	X	5	l.	1	l. Unterl.
	X	5	l.	1	l. Oberl.
Sputumtröpfch.	I	$4^1/_2$	beide	1	r. Oberl.
an staubigen	I	$4^1/_2$	r.	1	r. Oberl.
Holzbrettern	I	7	beide	1	l. Oberl.
angetrocknet.	II	5	l.	1	l. Unterl.
Siehe S. 21	II	5	r.	1	r. Unterl.

* Wegen hochgradiger Lungentuberkulose nicht sicher festzustellen.
r. = rechts; l. = links; Kav. = Kaverne.

Von Interesse scheint mir zweitens, daß bei Tieren, die nach solcher primären Lungeninfektion länger als 3 Monate leben, sich infolge zentraler Gewebseinschmelzung in den Lungenherden *Kavernen* ausbilden können (vgl. Beobachtungen von *Veraguth, Cornet* u. a.).

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schluß.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Das in *kleinen und kleinsten Mengen*, im besonderen *auch in Form von Tröpfchen* auf Taschentücher, Staubtücher, Kleidung und den Fußboden verstreute Sputum *trocknet sehr schnell* und so vollständig, daß es bei Einwirkung mechanischer Erschütterungen von der Art, wie sie im täglichen Leben häufig vorkommen, sich in Form von Staub ablöst. Von diesem Staub besteht immer ein gewisser Anteil aus *feinstem flugfähigen* Material. Recht erheblich erscheint dieser Anteil innerhalb der

geringen, sich von leinenen und wollenen Stoffen im besonderen von Taschentüchern ablösenden Staubmenge. Vermischen sich ausgestreute Tröpfchen mit reichlichen Staubmengen z. B. eines beschmutzten Fußbodens, so wird, falls dieser Staub zur Aufwirbelung kommt, nur ein relativ sehr kleiner Teil der in den Tröpfchen enthaltenen Keime als feinster Staub die Luft auf längere Zeit verunreinigen können. Die weitaus größte Masse der Keime wird mit dem gröberen Staub schnell wieder zu Boden gerissen.

2. Die in Sputum eingeschlossenen Tuberkelbacillen sind *sehr widerstandsfähig gegen Austrocknen.* Selbst in dünnsten Sputumschichten und dem diffusen Tageslicht ausgesetzt, bleibt die Zahl der lebenden Keime in den ersten 24 Stunden nach dem Trocknen offenbar *noch auf voller Höhe,* später sinkt sie ab, aber nur ganz allmählich. Eine *Abschwächung der Virulenz konnte innerhalb der geprüften Zeit von 18 Tagen überhaupt nicht nachgewiesen werden.*

3. Die Erfahrungen von *Cornet, Chaussé* u. a., nach denen Meerschweinchen durch Staub an Kleidung, Wäsche, Teppiche usw. verschmierten Sputums *mit größter Leichtigkeit* zu infizieren sind, konnte von mir — wenigstens in einem unter ähnlichen Bedingungen angestellten Versuch bestätigt werden. Bei sämtlichen 4, dem Staube exponierten Meerschweinchen kam es infolge Einatmung feinsten Bacillenstaubes in die Lungen zu einer primären Tuberkulose der Lungen.

4. Auch beim Abbürsten und Klopfen wollener Tücher, die mit bacillenhaltigen *Sputumtröpfchen* beschmutzt waren, ebenso beim Abwischen in dieser Weise infizierter staubiger Holzbretter mit Staubtuch fand noch eine *so reichliche Ablösung von Tuberkelbacillen in feinstem Staube* statt, daß über $^1/_4$ der dem Staube exponierten Meerschweinchen von den Lungen aus infiziert wurden.

Nach den Ergebnissen meiner Versuche hat die Lehre *Cornets* eine wichtige *Ergänzung* zu erfahren. Gewiß ist die Verstreuung *gröberer* Sputummassen des Phthisikers ganz besonders gefährlich, weil in solchen Sputummassen oft sehr zahlreiche Tuberkelbacillen enthalten sind und weil die Bacillen in dicken Sputumschichten lange Zeit vor Vernichtung geschützt sind.

Derartige grobe Verschmutzungen z. B. des Fußbodens mit Sputum dürften aber in heutiger Zeit dank der unermüdlichen Propaganda *Cornets* wohl nur noch unter ganz desolaten Verhältnissen vorkommen. Dagegen wird die Ausstreuung *kleiner und kleinster Sputummengen* seitens des Kranken selbst dort häufig sein, wo der Kranke mit seinem Auswurf sorgfältig umgeht. In erster Linie wird die Kleidung und das Taschentuch des Phthisikers Sputumreste enthalten, die, wie ich zeigen konnte, in dünner Schicht schnell trocknen und schon sehr kurze Zeit nach dem Beginn des Trocknens sich als feinster flugfähiger Staub

ablösen können. Diese Eigenschaft, das schnelle Trocknen und die leichte Ablösbarkeit kommt nun hauptsächlich auch *den von Phthisikern verstreuten Tröpfchen* zu. Die Ausstreuung der Tröpfchen entzieht sich ferner in der Regel jeder Kontrolle seitens des Kranken und seiner Umgebung, und die zahlreichen auf Kleidung, Betten, Möbel, Decken, Teppiche, Fußboden, das Spielzeug der Kinder abgesetzten Bacillendepots sind unsichtbare höchst gefährliche Infektionsquellen, die aus einem schier unerschöpflichen Reservoir gespeist werden.

Die näheren Bedingungen der Tröpfchenverstreuung erforscht und auf diese Infektionsquelle immer wieder eindringlich hingewiesen zu haben, ist *Flügges* bleibendes Verdienst, mag man zu der Theorie der unmittelbaren Ansteckung durch Hustenstöße stehen wie man will.

Über die Verbreitung bacillenhaltigen Staubes in Phthisikerwohnungen hat man sich dadurch eine Vorstellung zu schaffen gesucht, daß man Staubproben aus solchen Wohnungen an Meerschweinchen verimpfte. Am sorgfältigsten sind in dieser Hinsicht die Untersuchungen von *B. Heymann* ausgeführt. *Heymann* fand, wenn er den Staub mit trocknem Pinsel entnahm, nur in 8% der Proben aus Privatzimmern und Krankenhäusern lebende Tuberkelbacillen. *Heymann* schließt daraus: „Es ist damit erwiesen, daß sich trockner, tuberkelbacillenhaltiger Staub nur in sehr geringer Menge in den Phthisikerräumen vorfindet.“ Dieser Schluß ist, wie ich gelegentlich meines Vortrages in Göttingen schon erwähnt habe, unzulässig, da *Heymann* das größte Reservoir der feinsten bacillenhaltigen Stäubchen, *den Fußboden*, gar nicht oder nur in kleinsten Abschn tten untersucht hat. Der Fußboden läßt sich nach dieser Methode allerdings nicht untersuchen, da eine Trennung des feinsten Staubes von gröberem Staub nicht möglich ist, *Heymann* hätte aber diesen Versuchsfehler mit in Rechnung ziehen müssen.

Jeder Beweiskraft ermangeln nun die Versuche von *Köhlisch*, mit dem aus Phthisikerwohnungen gesammelten Staub Meerschweinchen *durch Inhalation* zu infizieren. *Köhlisch* hatte in seinen Versuchen ein ganz negatives Resultat. Bei der geringen Zahl seiner Versuche und der von ihm angewandten Versuchsanordnung (Verstäubung des gesammelten Staubes mittels Gebläses) war ein positives Ergebnis von vornherein nicht zu erwarten.

Nun konnte *Chaussé* zeigen, daß sich Meerschweinchen, die wochenlang in Krankensälen von Phthisikern untergebracht werden, verhältnismäßig leicht infizieren. Von 5 solchen Versuchen waren 4 in verschiedenem Ausmaße positiv. Im ganzen wurden 30 von 76 Meerschweinchen infiziert. Die positiven Meerschweinchen boten sämtlich typische Erscheinungen der primären Lungeninfektion dar. Daraus geht aufs deutlichste hervor, daß die Infektion durch feinsten flugfähigen Staub stattgefunden hat, denn nur ein derartig feiner Staub vermag in die Lungen einzudringen. Auch *Bartel* und *Spieler* konnten unter ähnlichen Versuchsbedingungen Meerschweinchen infizieren. Die Tuberkulose ihrer Tiere ist teilweise durch Kontakte, teilweise aber auch augenscheinlich durch Einatmung bacillenhaltigen Staubes in die Lungen entstanden, eine Auffassung, für die auch *Ostermann* eintritt.

Aus den hier mitgeteilten Erfahrungen müssen wir die Überzeugung gewinnen, daß für die Übertragung der Tuberkulose der Staubinfektion eine sehr große Bedeutung beizumessen ist, aber erst wenn wir alle Erfahrungen, auch die über andere wichtige Übertragungsweisen der

Tuberkulose, zusammennehmen, besteht Aussicht, zu einer *abschließenden Bewertung* der Staubinfektion zu gelangen.

Im Rahmen dieser Arbeit muß ich es mir versagen, noch einmal auf die Frage der Kontaktinfektion einerseits, der Tröpfcheninfektion andererseits ausführlich einzugehen. Ich beschränke mich darauf, einige Gesichtspunkte hervorzuheben, die mir für eine vergleichende Beurteilung der verschiedenen Ansteckungsarten wesentlich zu sein scheinen.

Aus meinen Untersuchungen über orale, konjunktivale und nasale Infektion des Meerschweinchens mit Tuberkelbacillen habe ich geschlossen, daß wir mit derartigen Infektionen auch beim Kinde *in größerem Umfange* rechnen müssen, als dies bisher vielfach angenommen wurde. Die Bedeutung der Kontaktinfektion für die Verbreitung der Lungenschwindsucht darf aber nicht so hoch eingeschätzt werden wie die der aerogenen Lungeninfektion, und zwar hauptsächlich aus zwei Gründen: Erstens gelingt zwar die Infektion vom Nasenrachenraum, vom Darmkanal aus usw. bei empfänglichen Versuchstieren noch mit sehr kleinen Bacillenmengen, der *Infektionserfolg ist aber selbst bei Aufnahme sehr großer Keimmengen per os auffallend unregelmäßig und anscheinend bei den verschiedenen Tierspezies an eine besondere Disposition der Schleimhäute bzw. ihres lymphatischen Apparates geknüpft.* Demgegenüber gelingt die Infektion der *Lungen* durch Einatmung einzelner geringer Erreger *mit größter Sicherheit,* bei Meerschweinchen offenbar mit einem einzigen Bacillus. Zweitens sprechen auch die pathologisch-anatomischen Erfahrungen am Menschen, wenn sie auch über die Häufigkeit von Kontaktinfektionen nichts Endgültiges aussagen, doch sehr zugunsten der überragenden Bedeutung der direkten aerogenen Lungeninfektion.

Was nun die *Tröpfcheninfektion* betrifft, so möchte ich folgendes hervorheben: Wohl mag in hygienisch schlecht erzogenen Bevölkerungsschichten ein Anhusten gesunder Personen durch Kranke öfter stattfinden und dabei auch nicht so ganz selten eine Reihe von Bedingungen zusammentreffen, die, wie wir wissen, für die Einatmung von Hustentröpfchen notwendige Voraussetzung sind. Meine Untersuchungen mit *Keschischian* haben aber ergeben, daß das Gros der Hustentröpfchen für die Einatmung *in die Lungen* überhaupt nicht in Betracht kommt, vielmehr nur die höchst selten anzutreffenden Hustentröpfchen bis zu 20 μ Durchmesser, vielleicht ausnahmsweise einmal solche zwischen 20 und 100 μ. Nach den von *Strauß* angestellten Erwägungen würde an Stelle von 20 etwa 10 μ, an Stelle von 100 etwa 50 μ zu setzen sein. Wenn von *Strauß* unsere Versuchsanordnung als willkürlich bezeichnet wird[1]), so sei darauf hingewiesen, daß *Flügge* auf die Experimente von *Paul,* der *nach dem gleichen Prinzip* Untersuchungen über Tröpfchen angestellt hat, den größten Wert legte, da sie ihm die sehr

[1]) *Strauß,* Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 416. 1925.

große Invasionsfähigkeit der Hustentröpfchen zu beweisen schienen. Wir wissen heute, daß die von unseren Schlußfolgerungen erheblich abweichenden von *Paul* darauf zurückzuführen sind, daß er die Hustentröpfchen ohne weiteres mit den Tröpfchen eines *Buchner*-Sprays identifizierte. Im übrigen gebe ich gern den bedingten Wert solcher Experimente zu; vielleicht gelingt es den Vertretern der Tröpfchentheorie eine andere, bessere Versuchsanordnung zu finden, die gestattet, für die Annahme des häufigen Eindringens von *Hustentröpfchen* in die Lungen eine Grundlage zu schaffen, wie sie für feinste bakterienführende Staubteilchen längst besteht.

Mit der Anschauung, daß Hustentröpfchen mit Bacillen nur selten zur Einatmung in die Lungen gelangen, stimmen nun die Ergebnisse der Tierversuche gut überein. Von *B. Heymann* und *Hippke* wird betont, daß sie *unter zahlreichen Phthisikern immer nur einige wenige* fanden, die imstande waren, mit ihren Hustenstößen Meerschweinchen zu infizieren. Die dabei erreichten positiven Resultate — bei *Hippke* noch dazu zum großen Teil sichere *Kontaktinfektionen* — wurden *um so spärlicher, je mehr die Versuchsanordnung den natürlichen Verhältnissen angepaßt wurde.* Z. B. konnte *Chaussé* in einem Versuch, in dem die Meerschweinchen in *engem Behältnis* die ihnen durch ein Rohr zugeleitete mit Hustentröpfchen angereicherte Luft der Hustenstöße zu atmen gezwungen waren, von 152 exponierten Tieren 31 infizieren. Wählte *Chaussé* in einem anderen Versuch zur Unterbringung der Tiere einen fünfmal größeren Behälter (86 Liter Inhalt), so wurde von 79 Meerschweinchen nur 1 Tier tuberkulös. *Man vergleiche damit das Ergebnis der unter natürlichen Bedingungen angestellten Staubinfektionsversuche!*

Es ist also durch nichts erwiesen, daß die *direkte Infektion der Lungen durch inhalierte frische Hustentröpfchen praktisch eine beachtenswerte Rolle spielt.* Die Möglichkeit einer solchen Infektion soll nicht in Abrede gestellt werden; wenn es überhaupt zu einer Infektion Gesunder durch die ihm beim Husten ins Gesicht geschleuderten Tröpfchen kommt, so wird in der Regel diese Infektion wohl eine *Kontaktinfektion* sein, ausgehend vom Nasenrachenraum bzw. den Bindehäuten.

Bei Abwägung aller Beobachtungen, die über die einzelnen Infektionswege bis heute vorliegen, gelange ich zu der Überzeugung, *daß der Staubinfektion unter den verschiedenen Übertragungsweisen der menschlichen Tuberkulose eine überragende Bedeutung zugeschrieben werden muß.*

Literaturverzeichnis.

Arnold, Untersuchungen über Staubinhalation und Staubmetastase. Leipzig 1885. — *Bartel* und *Spieler*, Wien. klin. Wochenschr. 1906, S. 25; 1907, S. 1144. — *Beninde*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **30**, 193. 1899. — *Chaussé*, Bull.

de l'acad. de méd. **69**, 407 und **70**, 128. 1913; Ann. de l'inst. Pasteur **28**, 720 und 771. 1914; Rev. de la tubercul. 1913, S. 350; Ann. de l'inst. Pasteur **30**, 613. 1916; Bull. de l'inst. Pasteur **15**, 33 und 65. 1917. — *Cornet*, Berlin. klin. Wochenschr. 1898, S. 317. — *Cornet*, Die Tuberkulose. Wien 1907. — *Flügge*, Die Verbreitungsweise und Bekämpfung der Tuberkulose. Leipzig 1908. — *Flügge*, Grundriß der Hygiene. Leipzig 1921. — *Heymann, B.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **30**, 132. 1899; **38**, 21 und 49. 1901 und **86**, 245. 1918. — *Hippke*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**, 122. 1921. — *Jellenigg*, Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **61**, 256. 1925. — *Kirstein*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **50**, 186. 1905. — *Köhlisch*, Ebenda **60**, 508. 1908; **81**, 203. 1916. — *Kuss*, Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **147**, 272. 1908. — *Lange, B.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **103**, 1. 1924. — *Lange, B.* und *Keschischian*, Ebenda **104**, 256. 1925. — *Lange, B.* und *Nowosselsky*, Ebenda **104**, 286. 1925. — *Neißer, M.*, Ebenda **27**, 175. 1898. — *Noetel*, Ebenda **48**, 13. 1904. — *Ostermann*, Ebenda **60**, 375. 1908. — *Paul*, Ebenda **40**, 468. 1902. — *Stern*, Ebenda **7**, 44. 1889. — *Sticher*, Ebenda **30**, 163. 1899. — *Veraguth*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **17**, 261. 1883.

Über den Abbau der Mikroorganismen in vivo.

I. Mitteilung.

Von

Dr. Josef Schumacher und Dr. Walther Liese.

Mit 15 Abbildungen.

In den bisher veröffentlichten Arbeiten, in denen die Veränderungen von Bakterien studiert wurden, die künstlich dem Tierkörper einverleibt worden waren, beschränkte man sich meistens darauf, irgendeine einzelne verfolgbare, charakteristische morphologische oder biologische Eigenschaft des betreffenden Bacillus fortlaufend zu beobachten. Um ein Beispiel zu nennen, kontrollierte *S. Bergel*[1]) den Abbau des Tuberkelbacillus in der Bauchhöhle der weißen Maus bzw. des Meerschweinchens mit Hilfe der Ziehlschen, Gramschen und Muchschen Färbung, zuletzt denjenigen der Spirochaeta pallida. *Korff-Petersen*[2]) studierte das Verhalten von säurefesten Bacillen im Meerschweinchenkörper und konnte dabei feststellen, daß säurefeste Mikroorganismen, die ihre Säurefestigkeit bei der Züchtung auf künstlichem Nährboden eingebüßt hatten, im Tierkörper nach einigen Stunden wieder säurefest wurden. Es liegt in der Natur solcher Versuche, bei denen die laufende Entnahme des Materials aus dem Tierkörper nur spärliche Mengen davon ergeben kann, daß ein analytisches Arbeiten lediglich mit Hilfe bestimmter Zellfärbungen betrieben werden kann, wo man also aus deren positiven oder negativen Ausfall gewisse Schlüsse bezüglich der Veränderung der dem Tierkörper einverleibten Bakterien ziehen kann. Solche Färbungen sind z. B. die Ziehlsche Färbung als Kriterium der Säurefestigkeit, die Gram- und Muchsche Färbung als Anhaltspunkt für die Gegenwart der die Gramfestigkeit bedingenden Zellsubstanzen. Man war aber bisher noch nicht in der Lage, den *progressiven* Zellabbau in seinen *einzelnen Phasen analytisch* zu verfolgen, den der Körper mit den einverleibten Bakterien bis zu ihrem *völligen Verschwinden* bewältigt. Das war erst mit einem Zellmaterial möglich, bei dem einerseits die *Zellinhaltsstoffe chemisch genauer bekannt* waren und bei dem andererseits die, wenn man so sagen

[1]) Die Syphilis im Lichte neuer experimentell-biologischer und immun-therapeutischer Untersuchungen. Verlag von Gustav Fischer, Jena 1925.

[2]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref., **73**, 435, s. a. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**.

darf, farbanalytische Methodik so ausgebildet war, daß man wußte, welche Zellbausteine mit den einzelnen Färbungen speziell dargestellt werden. Diese Vorbedingungen dürften durch die diesbezüglichen Arbeiten[1]) von *Schumacher* gerade bei der Hefezelle in solchem Maße erfüllt sein, daß uns eine erfolgreiche Bearbeitung des Abbauproblems im Tierkörper aussichtsreich erschien. Außerdem war auch gerade hier infolge der Möglichkeit, bei diesem Zellmaterial mit so großen Mengen arbeiten zu können, wie sie ein makrochemisches Arbeiten erforderlich machen, von *Schumacher* der Beweis erbracht, daß die farbanalytischen *Mikromethoden* den betreffenden *makro*chemischen Untersuchungen völlig entsprechen. Die mit diesen Methoden erhaltenen Resultate dürften mithin exakt genug sein, um sie für die Auswertung der unten beschriebenen Versuche benutzen zu können.

Ohne auf die betreffenden Arbeiten von *Schumacher* näher eingehen zu wollen, soll hier nur das kurz erwähnt werden, was zum Verständnis unserer Untersuchungen nötig ist. Das gewonnene Material wurde mit *Methylgrün*, *Methylenblau*, *Fuchsin*, *Viktoriablau*, *Erythrosin*, nach *Giemsa*, nach *Gram* und nach der *Schumacherschen Viktoriablau-Kaliumquecksilberjodid-Chininmethode*[2]) (Sch. Vk.) in bekannter Weise gefärbt.

Während der positive Ausfall der *Methylenblau*färbung zunächst nur ganz allgemein die *Anwesenheit saurer Substanzen* in der Zelle anzeigt, die also Albumosen, Nucleoproteide, freie Nucleinsäure usw. sein können, ist die *Methylgrün*färbung ein empfindliches Spezialreagens für *Nucleoproteide*, deutlicher gesagt, für den Nucleinsäureanteil dieser Eiweißverbindungen[3]). Die Färbung mit dem sauren *Erythrosin* zeigt bei ihrem positiven Ausfall andererseits das *basische* Eiweiß der Zelle an. Die *Fuchsin*färbung und in noch speziellerem Sinne die *Viktoriablau*färbung[4]) hingegen sind als Nachweis für die *lipoidhaltigen Zellinhaltsstoffe* und ihre Eiweißverbindungen, die sogenannten *Lipoproteide*, anzusehen,

---

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **73**, 337; 1922 und „Zur Chemie der Zellfärbung". Mitt. I—VIII. Chemie d. Zelle u. Gewebe. 1926 und „Über die färberische Darstellung der verschiedenen Zellinhaltsstoffe". Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. (im Druck).

[2]) Wobei man auseinanderhalten möge, daß Viktoriablau selbst alle Lipoide und Lipoideiweißverbindungen darstellt, als Viktoriablau-Kaliumquecksilber-Chininmethode jedoch *nur* die grampositiven Lipoideiweißverbindungen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. **94**, 399.

[3]) Es konnte ja gerade gezeigt werden, daß künstlich nucleinsäurefrei gemachte Hefe sich nicht mehr mit Methylgrün färbt. Wo dieser Nachweis nicht speziell geführt ist, schließen wir lediglich aus der Methylgrünfärbung noch nicht auf Nucleinsäure, sondern erst dann, wenn die betreffende Substanz außerdem auch die bekannten physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nucleinsäure oder ihrer Eiweißverbindungen zeigt.

[4]) Dermatl. Wochenschr. **79**, 1457. 1924.

sofern man vorher auf künstlichem Wege hydrolytisch die Nucleoproteide und alle anderen sauren Zellinhaltsstoffe aufgespalten hat, also die sich sonst ebenfalls mit Fuchsin und Viktoriablau färbende Nucleinsäure aus den Zellen eliminiert hat. Dasselbe gilt, wenn unter normalen Verhältnissen in vivo wahrscheinlich auf fermentativem Wege dieser Abbau der Mikroorganismen eingesetzt hat, was wir an dem Auftreten einer *negativen* Methylgrün- und Methylenblaufärbung zu erkennen vermögen. Mit anderen Worten: Aus einer positiven Fuchsin- oder Viktoriablaufärbung bei gleichzeitig vorhandener positiver Methylgrün- oder Methylenblaufärbung kann man nur auf die Gegenwart von sauren Zellinhaltsstoffen schließen, eine *positive* Fuchsin- und Viktoriablaufärbung bei *negativer* Methylgrün- oder Methylenblaufärbung aber beweist die Gegenwart von Lipoiden oder Lipoproteiden, die wieder durch ihre verschiedene Löslichkeit in Alkohol und Äther zu unterscheiden sind. Die Gegenwart spezieller Lipoproteide, die beispielsweise die Gramfestigkeit bedingen, ist naturgemäß mit der Gramschen Färbung und in ergänzender Weise mit der Sch.schen Vk.-Methode zu kontrollieren, zumal das Viktoriablau, wie *Schumacher* nachweisen konnte, als ausgesprochenster Lipoidfärber noch bestimmte Lipoide anfärbt, die bei negativer Gram- und selbst bei negativer Fuchsinfärbung in der Zelle noch vorhanden sein können. *Die Giemsafärbung ist von uns nicht als analytische Färbung in diesem Sinne benutzt worden*, sondern dient lediglich als Kontrolle für die mehr morphologischen Veränderungen der Zellen, einschließlich der Leukocyten.

Für die Versuche wurden 0,5 g käufliche Bäckerhefe mit 20 ccm Kochsalz suspendiert, mehrmals gewaschen und schließlich zur Abtötung der Zellen $^1/_2$ Stunde lang im Wasserbad bei etwa 75° erhitzt. Sodann wurde hiervon 6 Mäusen je 0,5 ccm intraperitoneal und 6 Mäusen je 0,5 ccm subcutan eingespritzt. In Abständen von 24 Stunden wurde je 1 Maus getötet, seziert und das injizierte Zellenmaterial, das bei den subcutan gespritzten Mäusen an der inneren Hautwand als kleines schmieriges Klümpchen, bei den intraperitoneal gespritzten Tieren als fein verteilter nasser Niederschlag auf den Organen und Darmschlingen wiedergefunden wurde, entnommen, auf Objektträger ausgestrichen, hitzefixiert und gefärbt. Nach 5 Tagen war meistens makroskopisch von den eingespritzten Zellen nichts mehr vorzufinden, ein Befund, der mit dem mikroskopischen Befund übereinstimmte.

Wie die beigefügten Bilder erkennen lassen, haben die subcutan einverleibten Hefezellen bereits nach 24 Stunden fast restlos ihre *Nucleinsäure* verloren. Daher ist sowohl die Methylgrünfärbung (Abb. 1, ob. lk. H.) wie auch die Methylenblaufärbung (Abb. 1, u. Hälfte) negativ geworden.

Die *Lipoideiweißverbindungen* hingegen müssen im allgemeinen noch unversehrt in der Zelle vorhanden sein, wie die starke Fuchsinfärbung in Abb. 1 ob. r. Hälfte erkennen läßt und der positive Ausfall der Gramfärbung in Abb. 2 ob. lk. Hälfte anzeigt. Das Sch. Vk.-Bild (2 unt.

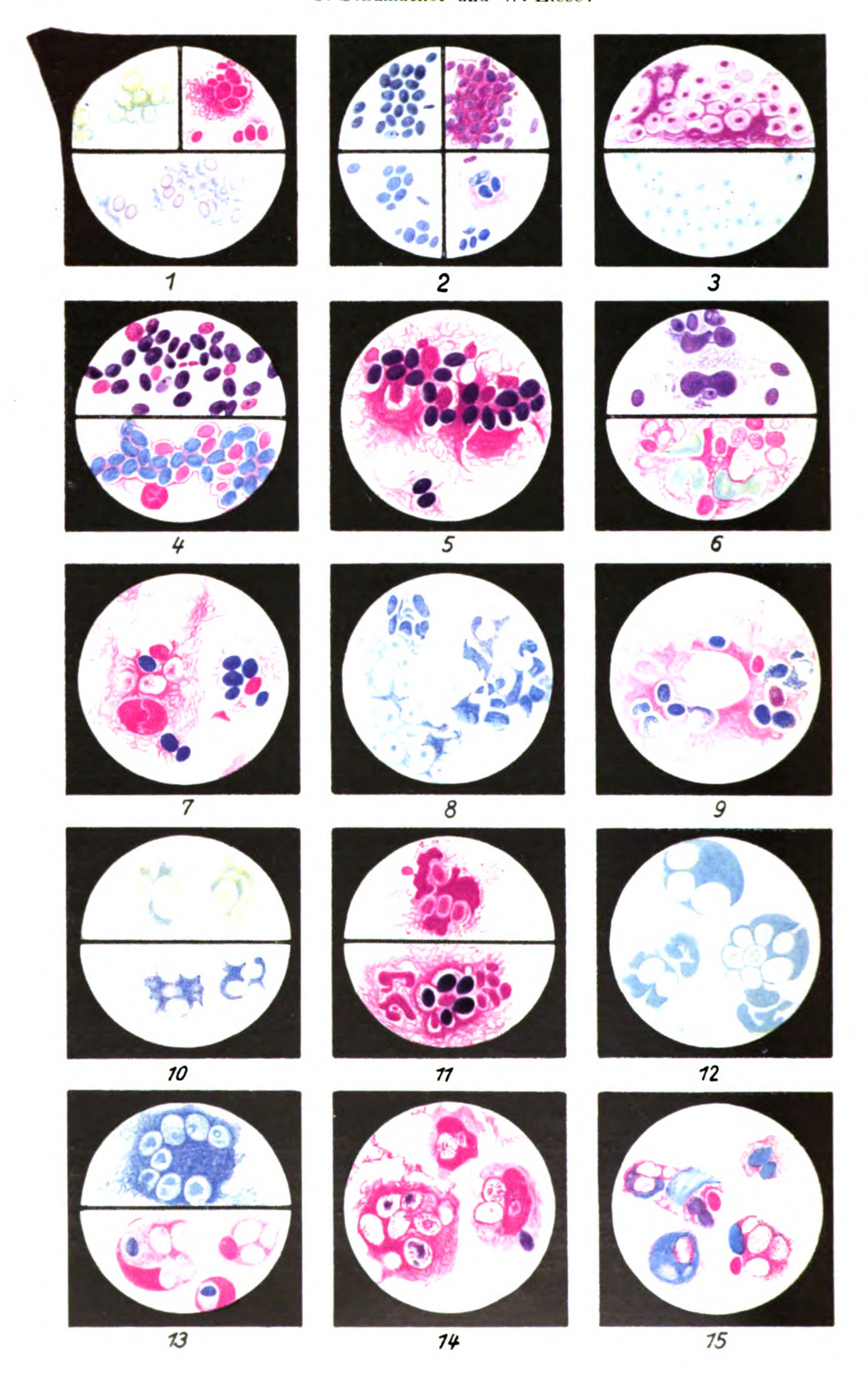
lk. Hälfte) und das Grambild mit Fuchsingegenfärbung (2 ob. r. H.) bestätigen diese Ergebnisse ebenso wie die in Abb. 3 ob. H. gezeichnete Giemsafärbung, wo besonders schön hervortritt, daß die Hefezellen ihre Nucleinsäure verloren haben müssen, weil normalerweise die Giemsafärbung in ihnen den Hefekern nicht nur *nicht* sehen läßt, sondern die Zelle in toto blauviolett färbt[1]).

Am zweiten Versuchstag zeigt auch das Methylenblaubild (3 u. H.) deutlich das allmähliche Sichtbarwerden des Hefekerns, d. h. also, daß zwar — in Übereinstimmung mit Abb. 4 o. H., das eine Gramfärbung mit Fuchsingegenfärbung darstellt, die gegenüber dem ersten Tag erheblich schwächer geworden ist —, die Lipoproteide weiter abgebaut worden sind, daß aber die den Kern bildenden speziellen Lipoideiweißverbindungen, die *Karyoproteide*, noch ziemlich unversehrt sind. Abb. 4 u. H. als Sch. Vk.-Bild, wo schon zahlreiche viktoriablaunegativ gewordene Zellen sichtbar werden, bestätigt diese Schlüsse, da es mit den in Abb. 4 ob. H. erhaltenen Resultaten der Gramschen Färbung übereinstimmt.

Vom *dritten Tage* ab erscheinen jetzt die Leukocyten in erheblich größerer Menge als an den beiden ersten Tagen, wo sie nur dünn und vereinzelt aufgetreten waren. Das gibt deutlich Abb. 5 wieder, das eine Gramfärbung mit Fuchsingegenfärbung zeigt. Es sind jetzt schon ebensoviel gramnegative Zellen vorhanden als grampositive. Die Aufspaltung und der Abbau der Lipoide schreitet weiter fort. Das bestätigt auch die Giemsafärbung in Abb. 6 ob. H., wenn man sie im Vergleich zum entsprechenden 1. Tag (Abb. 3 ob. H.) betrachtet, ohne daß aus der Giemsafärbung, wie oben schon betont, irgendwelche Schlüsse gezogen werden sollen. In Abb. 6 u. H. ist eine Methylenblaufärbung mit Erythrosinnachfärbung gezeichnet, wobei das Methylenblau durch Zwischenbehandlung mit 5proz. Tannin nach bekannten Regeln fixiert wurde. Hier sieht man neben den blau gefärbten Leukocytenkernen bei *einzelnen* Hefezellen auch schon das sehr bemerkenswerte allmähliche *Verschwinden der Erythrosinfärbung*. Auch die basischen Eiweiße der Zelle erliegen — anscheinend parallel dem übrigen Abbau gehend — ihrer fermentativen Auflösung. In Abb. 7, das ein Bild der Sch.-Vk.-Methode wiedergibt, bemerkt man deutlich, daß der größere Teil der Zellen — der phagocytierte bereits restlos — sein viktoriablau- resp. gram*positives* Lipoid verloren hat, daß aber vereinzelte Zellen,

---

[1]) In Abb. 2 u. r. H. ist ein Ausstrich nach der Glycerin-Viktoriablau-Kaliumquecksilberjodid-Chininalkohol-Safraninfärbung gezeichnet. Hier sieht man in den Begleitbakterien der Hefe aber doch schon, daß der Lipoidabbau eingesetzt hat. In dem oben liegenden Stäbchen erkennt man nur die Membran und offenbar den Kern tiefblau gefärbt. Der übrige Zellinhalt jedoch ist bereits viktoriablaunegativ geworden und hat sich daher safraninrot gefärbt.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

wie ihre *intensive Fuchsinfärbung* anzeigt, noch ihr gram*negatives* Lipoid besitzen müssen. Die übrigen nahezu völlig ungefärbten Zellen hingegen müssen schon beinahe frei von Lipoideiweißverbindungen sein, da weder das Fuchsin in ihnen noch einen Lipoidgehalt, noch das Erythrosin einen Eiweißgehalt anzuzeigen vermag. Die blau gefärbten Exemplare aber sind, da die Methode der Gramschen entspricht, noch grampositiv. Sie besitzen also noch ihre sämtlichen Lipoideiweißverbindungen und sind dem Abbau der Lipoide anscheinend noch nicht anheimgefallen.

Vom *vierten Versuchstag* ist in Abb. 8 eine Methylenblaufärbung wiedergegeben. Soweit hier die Zellen phagocytiert sind, sind sie ungefärbt. Bei den übrigen sind noch die sogenannten Karyoproteide schwach angedeutet. Das ist ein Bild, wie man es beim Arbeiten in vitro etwa nach 2—4stündiger Behandlung der Zellen mit 1 : 4 verdünnter kalter Salzsäure erhält. Abb. 9 zeigt die Sch.-Vk.-Färbung am 4. Versuchstag mit Safraninnachfärbung. Abgesehen von vereinzelten Zellen, die bei der Durchmusterung einer größeren Zahl von Gesichtsfeldern noch viktoriablau- resp. gramfest sind, haben die meisten zwar das grampositive Lipoid verloren, weisen aber doch noch gelegentlich, sofern sie tiefsafraninrot gefärbt sind, ihr gramnegatives Lipoid auf. Sehr schön kommt dieser allmählich weiterschreitende Lipoidabbau bei denjenigen Zellen zum Ausdruck, die so eigentümlich blau gepünktelt erscheinen.

Die Abb. 10—15 zeigen den Abbau bei *intraperitonealer Einverleibung* der Hefezellen. Die allmählich verschwindende Methylgrünfärbung (Abb. 10 ob. H.) und die schon nahezu verschwundene Methylenblaufärbung (Abb. 10 u. H.) zeigen hier wie oben, daß die Nucleinsäure aus den Hefezellen nahezu verschwunden ist, im deutlichen Gegensatz zu den sie phagocytierenden weißen Blutzellen, die ihren sich tiefblau färbenden Kern besitzen müssen. Bemerkenswert ist auch die gleich am ersten Tag lebhaft eintretende Phagocytose, die in diesem Maße beim subcutanen Versuch erst am dritten Tag festzustellen war. Abb. 11 o. H. zeigt die Fuchsinfärbung, Abb. 11 u. H. die Gramfärbung mit Fuchsingegenfärbung. Auch hier läßt ein Vergleich mit dem ersten Versuch wohl einwandfrei erkennen, daß der Abbau der Lipoproteide wenigstens des Gramlipoproteids, erheblich intensiver vor sich geht. Während bei dem entsprechenden Versuch mit subcutaner Einverleibung der Hefe die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch restlos grampositiv waren, sind sie hier fast zur Hälfte schon gramnegativ.

Abb. 12 zeigt ein Methylenblaubild vom *dritten* Tage. Die Hefezellen sind kaum noch freiliegend und nur noch stellenweise leicht angefärbt zu finden.

Abb. 13 o. H. zeigt einen Ausstrich vom *vierten* Tage, mit *gewöhnlichem* (!) Viktoriablau gefärbt. Aus dieser Färbung kann also auf das

Vorhandensein von Lipoiden oder Lipoideiweißverbindungen geschlossen werden, ebenso wie aus einer positiven Fuchsinfärbung, da die Methylgrün- und Methylenblaufärbung jetzt negativ geworden sind. Es ist aber noch nicht der Schluß möglich, ob das betreffende Lipoid viktoriablau- resp. grampositiv oder -negativ ist. Dies ist erst aus Abb. 13 u. H. (Sch.-Vk.-Methode und Safraninnachbehandlung) zu erkennen, und endlich aus Abb. 14: Gramfärbung mit Fuchsingegenfärbung. Abb. 14 nach *Gram* entspricht also absolut Abb. 13 u. H. nach *Schumacher* gefärbt. Diese drei Bilder demonstrieren wieder sehr schön, wie bei reichlicher Phagocytose die Lipoproteide schnell abgebaut werden, und zwar meistens sowohl die grampositiven wie die gramnegativen gleichzeitig. Nur bei ganz wenigen Zellen sieht man in Abb. 14 noch Reste des negativen Lipoids in der stellenweise schwach angedeuteten Fuchsinfärbung, Reste des grampositiven Lipoproteids in der stellenweise noch schwach vorhandenen Gramfärbung. In Abb. 15 endlich ist ein Ausstrich nach Methylenblauvorfärbung, 5proz. Tanninzwischenbehandlung und Erythrosinnachfärbung wiedergegeben. An zwei noch schön mit Erythrosin rot gefärbten Zellen erkennt man, daß diese ihr basisches Eiweiß noch enthalten, während die übrigen Zellen restlos abgebaut sind. Sehr deutlich kommen auch bei diesem Bild wieder die blau gefärbten Kerne der weißen Blutkörperchen heraus.

Ergebnisse.

1. Sowohl bei *subcutaner* wie auch bei *intraperitonealer* Einverleibung abgetöteter Mikroorganismen in den Tierkörper erfolgt prinzipiell deren Abbau in gleicher Weise. Jedoch verläuft der ganze Prozeß bei dem subcutanen Versuch langsamer als bei dem entsprechenden Intraperitonealversuch, der mit intensiverer Phagocytose verläuft.

2. Eine gewöhnliche *Auflösung* der eingeführten Mikroorganismen dürfte nicht in Frage kommen, da die Zellfärbungen, die die Gegenwart verschiedener Zellinhaltsstoffe nachweisen, nicht sämtlich zu *gleicher Zeit* verschwinden, sondern sukzessive. Es kommt nach den vorliegenden Bildern nur ein *allmählicher Abbau* der verschiedenen Zellinhaltsstoffe in Frage, wobei, wie bei dem künstlichen Abbau mit Mineralsäuren, die am leichtesten hydrolysierbaren Zellinhaltsstoffe, die Nucleoproteide, zuerst dem Abbau anheimfallen, wie die zuerst verschwindenden Methylgrün- und Methylenblaufärbungen beweisen. Dagegen scheint der Abbau der verschiedenen Lipoideiweißverbindungen, sowohl der grampositiven als auch der gramnegativen gleichzeitig einzusetzen. Im Gegensatz zu dem künstlichen Abbau in vitro, bei dem nur die sauren Komponenten der Nucleoproteide und Lipoideiweißverbindungen dem Abbau und Entfernung aus der Zelle anheimfallen, wird hier in vivo das *ganze* Molekül mit dem basischen Eiweißanteil in Angriff genommen, was dadurch

bewiesen wird, daß sehr bald im allgemeinen hier auch die Darstellung der basischen Eiweiße mit dem sauren Erythrosin versagt, neben einzelnen Zellen, die ihr basisches Eiweiß noch nicht verloren haben, wie die positive Erythrosinfärbung in *demselben* Bild beweist.

In weiteren Mitteilungen werden wir darüber berichten, wie sich *lebende* Hefe dem Abbau in vivo gegenüber verhält und welche Veränderungen eintreten, wenn der Tierkörper *mit Lipoideiweißverbindungen vorbehandelt* worden ist. In diesem Falle kommt es zu einer erhöhten Produktion der *lipoproteolytischen Fermente*, womit der Körper auf Zufuhr von Lipoideiweißverbindungen reagiert und die alsdann auch rascher die Lipoideiweißverbindungen hydrolytisch auf fermentativem Wege aufspalten.

(Aus dem Allgemeinen Krankenhause Barmbeck, Hamburg.)

Klinischer Beitrag zur Tollwutschutzimpfung und Bericht über einen Fall von atypischer Lyssa.

Von
A. V. Knack.

Die Tollwutschutzimpfung hat infolge der zunehmenden Verbreitung der tierischen Tollwut in den letzten Jahren weitere ärztliche Kreise zu interessieren begonnen, zumal infolge des gehäuften Vorkommens von Bißverletzungen durch tollwutkranke Tiere neben den Tollwutschutzimpfungsstationen in Berlin und Breslau in einigen Orten Deutschlands Behandlungsstellen eingerichtet wurden, in denen dort vorkommende Fälle mit einem aus dem Institut „Robert Koch" gelieferten Impfstoff behandelt wurden, so in Dresden, München, Stuttgart und Hamburg. Im Februar 1924 richtete das Hamburger Gesundheitsamt mit Genehmigung des Reiches eine solche Behandlungsstelle in unserem Krankenhause ein. Die Neueinrichtung solcher Stationen in verschiedenen Städten war dadurch erleichtert, daß die Wutschutzabteilung des Instituts für Infektionskrankheiten „Robert Koch" seit Ende des Jahres 1923 eine Modifikation der Impfstoffbereitung und -verwendung eingeführt hatte in Form einer Glycerinemulsion des Gehirns mit Virus fixe infizierter, in der Agone getöteter Kaninchen[1]).

Über Einzelheiten der Impftechnik wurden wir in entgegenkommenderweise im Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch" an Ort und Stelle unterrichtet. Trotzdem hielten wir es im Anfang für zweckmäßig, die Impflinge während der Dauer der Impfung im Krankenhause aufzunehmen und eingehend klinisch zu beobachten. Während wir anfangs sämtliche Patienten im Krankenhause aufnahmen, gingen wir später dazu über, nur solche aufzunehmen, bei denen besondere Vorsicht während der Impfung geboten schien, so Impflinge, die bereits bei der ersten Untersuchung körperliche Störungen aufwiesen, außerdem Kinder und solche Personen, die außerhalb Hamburgs ihren Wohnsitz hatten und andernfalls in einem Hotel hätten untergebracht werden müssen. Regelmäßig aufgenommen wurden Impflinge auch dann, wenn sich bei ihnen nennenswerte Störungen irgendwelcher Art während der Impfperiode zeigten.

[1]) Vgl. hierzu die Mitteilung von *Boecker* in diesem Heft.

Die so gebotene Möglichkeit, die Wirkungen der Tollwutschutzimpfung am Krankenbette zu beobachten, gab uns Veranlassung, eine Lücke auszufüllen, die in der bisherigen deutschen Literatur über die Tollwutschutzimpfung noch vorhanden ist. Das schien uns um so notwendiger, als gerade seit Kriegsende in zunehmender Zahl Veröffentlichungen über das bedrohliche Krankheitsbild der „Impflyssa“ erschienen. Wir weisen hier auf die Arbeiten von *Kraus*, *Schweinburg* und *Koritschoner-Schweinburg* hin. Es ist für den unvoreingenommenen Beobachter selbstverständlich, daß, wenn derartig schwere Krankheitsbilder im Zusammenhang mit der Wutschutzimpfung auftreten können, leichtere Grade der Schädigung bei genauer klinischer Beobachtung häufiger gefunden werden müssen.

Die von uns vorgenommenen klinischen Untersuchungen hatten den Zweck, festzustellen,

1. ob die in ihrem praktischen Wert noch nicht über jeden Zweifel erhabene Methode der Wutschutzimpfung bei Durchführung unter einwandfreien Bedingungen Schädigungen irgendwelcher Art mit sich bringen kann;

2. ob bei der zur Zeit erreichten einfachen Versendbarkeit des Impfstoffs die Methode unbedenklich in die Hand eines erweiterten Kreises von Ärzten gegeben werden kann, so daß durch Abwesenheit vom Wohnort und von der Arbeitsstelle bedingte soziale Schwierigkeiten der Impflinge auf ein Mindestmaß beschränkt werden könnten.

Unsere Beobachtungen erstrecken sich in der Zeit vom 1. III. 1924 bis 19. III. 1925 auf eine Gesamtzahl von nahezu 200 Impflingen, unter denen von 175 Fällen genaue Aufzeichnungen gemacht wurden. Das verarbeitete Material wurde also auf einen Zeitraum von genau einem Jahre begrenzt; die Impfung der am Jahresende neu hinzukommenden Fälle war am 19. III. 1925 abgeschlossen. In der Bearbeitung des Materiales wurde ich von Herrn Dr. *F. Wyszynski* unterstützt.

Unter den 175 genau untersuchten Impflingen wurden stationär beobachtet 64, ambulant 111.

Nach dem Alter gliederten sich die Fälle wie folgt:

im Alter von	3— 5 Jahren	= 8
„ „ „	6—10 „	= 15
„ „ „	11—15 „	= 6
„ „ „	16—20 „	= 33
„ „ „	21—30 „	= 40
„ „ „	31—40 „	= 31
„ „ „	41—50 „	= 19
„ „ „	51—60 „	= 18
„ „ „	61—70 „	= 4
über	70 Jahre	= 1 (85 Jahre alt).

Dem Geschlecht nach handelte es sich um 117 männliche und 58 weibliche Personen.

Der Berufstätigkeit nach handelte es sich unter den Geimpften um 2 Ärzte, 5 Tierärzte, 2 Laboranten, 12 Polizeibeamte, 16 sonstige Beamte und Angestellte, 16 Kaufleute, 14 Handwerker, 33 Arbeiter, 30 im Haushalt tätige weibliche Personen, 26 Schüler, 2 Studenten, 7 Lehrlinge, 11 landwirtschaftliche Berufe, 8 Kinder unter 6 Jahren, u. a.

Es stammten aus dem Gebiet der Hansestädte Hamburg und Lübeck 109, aus den preußischen Nachbargebieten 59, aus Mecklenburg 7 Fälle.

Was die Bißgelegenheit angeht, so wurden

ohne besondere Veranlassung gebissen	144	Personen,
durch Reizung des Tieres gebissen	8	,,
beim Füttern gebissen	7	,,
beim Einfangen gebissen	10	,,
an tierischem Material infizierten sich im Laboratorium	4	,,
durch auf vorhandene Hautverletzungen gelangten Speichel von tollwutkranken Hunden	2	,,

Die Bißverletzungen wurden durch Hunde, Katzen und Pferde gesetzt, und zwar kamen 13 mal Katzen, 2 mal Pferde, im übrigen nur Hunde in Betracht. Bedauerlicherweise gelingt es ja nur in einem Teil der Fälle, die die Bißverletzungen verursachenden Tiere festzustellen und klinisch bzw. anatomisch zu untersuchen. In einer erheblichen Zahl der Fälle ist über das verletzende Tier eine Anamnese nicht zu erheben, da dasselbe nicht festgestellt werden konnte. Wiederholt wurden mehrere Personen von dem gleichen Tier verletzt. Von den in Betracht kommenden Tieren waren

frei von Tollwut	Hunde 7,	Katzen 1,	Pferde 0,
erkrankt an Tollwut . . .	,, 47,	,, 4,	,, 2,
verdächtig auf Tollwut . .	,, 87,	,, 9,	,, 0.

Die Impfung konnte aber auf die von diesen Tieren gebissenen Personen nicht beschränkt werden, da in den Fällen, in denen die Tiere entkommen waren, zum mindesten der Verdacht einer Tollwuterkrankung der betreffenden Tiere (auch auf Grund der Schilderung der Verletzten) nicht abgelehnt werden konnte.

Wir haben uns in allen den Fällen, in denen die Anamnese nicht einwandfrei die Gesundheit des Tieres erbringen konnte, entschlossen, die Schutzimpfung durchzuführen.

Der Sitz der Bißverletzungen verteilte sich in 162 Fällen wie folgt:

obere Extremitäten	96
davon Hand	87
untere Extremitäten.	54
davon Unterschenkel	23
Gesicht	7
Rumpf	5

Auch hier tritt, wie in den älteren Statistiken, die besondere Beteiligung der oberen Extremitäten, insbesondere der Hand hervor. Diese Erfahrung deckt sich mit den in zahlreichen früheren Statistiken (*Bollinger, Josef Koch, Tamhayn*) gegebenen Zahlen.

Bezüglich der Art der Wunden handelte es sich um

Bißwunden	in 150	Fällen
Kratzwunden	,, 12	,,
Schnittwunden am infizierten Material	,, 5	,,
einfaches Belecken durch wutkranke oder verdächtige Tiere	,, 8	,,

Die Erheblichkeit der Verletzungen war eine sehr verschiedene; in der übergroßen Mehrzahl der Fälle handelte es sich nur um leichtere, nicht besonders in die Tiefe dringende Verletzungen.

Durch Kleidungsstücke gebissen wurden 67 Fälle.

Eine Wundbehandlung fand statt:

sofort	in 154 Fällen
nach 3—7 Stunden	„ 3 „
„ 1 Tag	„ 11 „
„ 2 Tagen	„ 4 „
„ 3 „	„ 1 „
„ 6 „	„ 1 „
„ 8 „	„ 1 „

Die Behandlung fand, soweit nähere Angaben darüber vorliegen, statt:

durch Ausbrennen	in 4 Fällen
„ Excision	in 1 Fall
„ Ätzen mit starken Säuren	„ 4 Fällen

Behandlung mit essigsaurer Tonerde	in 19 Fällen
„ „ Jod	„ 32 „
„ „ Alkohol	„ 4 „
„ „ Äther	„ 2 „
„ „ Lysol	„ 2 „
„ „ Sodawasser	„ 1 Fall
„ „ trockenem Verband	„ 6 Fällen
„ „ Brunnenwasser	„ 5 „
„ „ feuchtem Verband	„ 4 „
„ „ Salbe	„ 5 „
„ „ Aussaugen der Wunde	„ 1 Fall

Die Impfung wurde begonnen:

am gleichen Tage	in 15 Fällen
nach dem 1. Tage	„ 26 „
„ 2—7 Tagen	„ 91 „
„ 8—14 „	„ 30 „
„ 2—3 Wochen	„ 15 „

In den Fällen, in denen eine klinische Beobachtung stattfand, wurden folgende Untersuchungen regelmäßig angestellt:

1. Eingehende allgemeine körperliche Untersuchung;
2. Blutdruckmessung;
3. Urinuntersuchung;
4. Bestimmung von Körpertemperatur und Körpergewicht;
5. Wassermannsche Blutuntersuchung;
6. morphologische Blutuntersuchung.

Die letzteren Untersuchungen wurden in bestimmten Intervallen wiederholt.

Bei den ambulant geimpften Patienten wurde auf die Feststellung des Körpergewichtes verzichtet, die Temperatur nur dann gemessen, wenn klinisch Verdacht auf eine Temperatursteigerung vorlag. Auch der Urin wurde nur von Zeit zu Zeit untersucht. Die übrigen Unter-

suchungen wurden in Abständen regelmäßig ebenso vorgenommen wie bei den klinisch beobachteten Patienten.

Der *Allgemeinzustand* der zur Impfung kommenden Personen schwankte erheblich. Sehr häufig bestand das Krankheitsbild der *Vasoneurose*, das wir auch sonst heutzutage weit häufiger zu sehen gewohnt sind als früher. Für die Durchführung der Wutschutzimpfung ist dieses Krankheitsbild insofern von besonderer Bedeutung, als es uns die Beobachtung initialer Störungen des Nervensystems infolge der Tollwutinfektion oder der Wutschutzimpfung erschweren kann. Nur einige Beispiele dafür:

Frl. M. gab an, Wadenkrämpfe zu haben, die sich durch den ganzen Körper bis zum Kopf zogen. Die weitere Beobachtung ergab einwandfrei das Vorliegen einer schweren depressiven Neurose.

Herr Bei . . . wurde wegen Krämpfen aufgenommen, die sich später als Hysterie herausstellten.

Herr Ber . . . zeigte ähnliche Erscheinungen. Er bekam noch bei der ersten Untersuchung einen Krampfanfall. Auch hier handelte es sich um eine schwere Neuropathie.

Wie große Vorsicht aber bei der Beurteilung solcher Fälle geboten ist, beweist eine Mitteilung von *Borger*, der über einen Lyssafall berichtet, der unter dem Bilde der Hysterie verlief und erst nach dem Tode durch Tierimpfung als echte Lyssa diagnostiziert wurde. Auch sehen wir bei Neurotikern häufig eine erhebliche Furcht vor den Folgen der Bißverletzungen, die dazu führt, das kleinste mit der Impfung einhergehende und während der Impfung aus anderer Ursache auftretende Beschwerden erheblich übertrieben werden.

In der großen Mehrzahl der Fälle verläuft die Schutzimpfung sowohl bei klinischer wie ambulanter Durchführung ohne eine nennenswerte subjektive oder objektive Störung. Trotzdem es sich um eine aktive Immunisierung handelt, bei der virulentes lebendes Erregermaterial in den Körper einverleibt wird, ist die Reaktion, sowohl was die *Körpertemperatur* anbetrifft, als auch was die *Beeinflussung des Blutbildes* angeht, eine nur geringe. Während die übergroße Mehrzahl der Fälle ohne Temperaturbeeinflussung verläuft, sehen wir in einzelnen Fällen geringe Temperaturbewegungen auftreten, die aber auch keinerlei Regelmäßigkeiten zeigten.

Die Frage der Beeinflussung des Blutbildes hat besonders in der ausländischen Literatur eine Rolle gespielt. Darüber berichtet *Remlinger* u. a.:

„*Carvalho* hat beim Studium des Arnethschen neutrophilen Bildes bei den in Lissabon behandelten Gebissenen eine Linksverschiebung des Bildes angegeben, das früher unverändert gefunden war von *Cornwall* und *Yver*. *Léger* schließt sich der Meinung von *Carvalho* an. Bei 25 von herumlaufenden Hunden Gebissenen und solchen, die sich der *Pasteur*schen Behandlung am Institut Hué unterworfen haben, hat er immer ein Arnethsches Blutbild gefunden, das deutlich eine Linksverschiebung aufwies. Die Verschiebung tritt bei den ersten Impfungen auf und hält

für die Dauer der Behandlung an. 7 Monate nach Beendigung der Kur behielt ein Gebissener noch eine Linksverschiebung, während ein anderer Gebissener nach einem Jahre ein normales Bild bot. *Léger* glaubt, damit vielleicht einen Faktor zu haben, der den Arzt in der mehr oder weniger intensiven Anwendung der Schutzbehandlung leiten könne. Dasselbe Kriterium war vorher von *Franca* gefordert worden nicht auf Grund der Polynucleären im strömenden Blut, sondern der Mononucleären, Lymphocyten und besonders der Vermehrung der Mastzellen. *Rochaix* hat keine Vermehrung der basophilen Polynucleären und keine Mastcellulose in dem Blut der Individuen beobachtet, die sich einer Wutschutzimpfung unterzogen haben, ebensowenig wie bei den Kaninchen, die mit Tollwutrückenmark oder mit normalem Mark infiziert wurden. Für *Carvalho*, der, und er nicht allein, keine Mastcellose beschrieben hat, soll die Vermehrung der Eosinophilen die konstanteste Veränderung des leukocytären Blutbildes sein bei den Personen, die der Behandlung folgen."

Wir können auf Grund unserer Untersuchungen eine auch nur einigermaßen regelmäßige Beeinflussung des Blutbildes nicht bestätigen. Zwar findet sich in einzelnen Fällen eine Zunahme der Gesamtzahl der Leukocyten, in anderen Fällen eine relative Vermehrung der Monocyten, in wieder anderen eine Vermehrung der eosinophilen Zellen. Diese Veränderungen zeigen aber in den 104 von uns zuerst beobachteten Fällen keinerlei Regelmäßigkeit, so daß bei einer Berechnung der Durchschnittswerte sich durchaus indifferente, wenig zu verwendende Zahlen ergeben, wie die nachfolgenden Tabellen zeigen:

Tag der Impfung	Impfstoffmenge ccm	Leukocyten-Gesamtzahl	Poly. %	Lymph. + Mono. %	Eos. %
1.	0,25	8 900	61,0	36,2	2,7
2.	0,5	9 300	55,5	41,1	4,4
3.	0,75	10 000	47,1	49	3,4
4.	0,75	9 000	51,6	42	5,7
5.	1,25	8 200	49,8	45,7	7,0
6.	1,25	9 700	51,9	42,1	4,7
7.	2,0	11 300	56,5	41,1	4,0
8.	0,75	10 500	49,7	45,8	4,6
9.	0,75	9 400	48,9	42,5	3,6
10.	0,75	10 000	56,7	39,4	3,3
11.	1,25	9 300	58,8	38,7	?,6
12.	1,25	8 700	50,9	42,7	5,8
13.	1,25	10 700	51,3	41,7	4,0
14.	2,0	9 200	51,0	40,5	3,7
15.	0,75	10 200	48,4	49,6	3,9
16.	0,75	9 700	57,5	38,1	3,3
17.	1,25	10 000	52,2	42,8	3,8
18.	1,25	10 300	48,3	46	2,0
19.	1,25	10 700	54,7	39,3	3,6
20.	2,5	10 100	59,9	37,6	2,8

Auch finden wir nicht regelmäßig die in der französischen Literatur erwähnte relative Verschiebung zwischen den stab- und segmentkernigen polynucleären Leukocyten. Auch hierfür einige Beispiele von solchen Fällen, bei denen häufig Blutuntersuchungen gemacht wurden:

		J.	St.	S.	Ly.	Eo.	Mo.	Ma.
D . . . l.	1. III. 1924	—	4	51	39	—	6	—
	2. III. 1924	—	2	45	45	5	3	—
	5. III. 1924	—	2	47½	47½	2	1	—
	6. III. 1924	—	—	45	49	2	4	—
	7. III. 1924	—	2	65½	22½	4	5	1
	10. III. 1924	—	4	51½	34½	3½	6½	—
	13. III. 1924	—	5	54½	35	4½	11	½
	15. III. 1924	—	2	48	27	3	10	—
	19. III. 1924	—	2	55	35	1	7	—
	22. III. 1924	—	1	44½	46½	2½	5	½
P . . . s.	4. III. 1924	—	2	55½	25	6	11½	—
	17. III. 1924	—	3	53	20	4½	19½	—
	22. III. 1924	—	3	48	32½	6	10½	—
	28. III. 1924	—	2	58½	34	2	3½	1
	7. V. 1924	—	5½	60	23	1½	10	—
	16. VI. 1924	—	2	52	28	6	12	—
Frau T . . . m.	10. III. 1924	—	—	37½	47	—	14½	1
	12. III. 1924	—	2½	55½	36½	2½	3	—
	18. III. 1924	1½	3½	63½	23½	1	8	—
	26. III. 1924	—	3	54	31½	1	10	½
R . . . ß.	15. III. 1924	—	1	27	57	3½	10½	1
	23. III. 1924	½	3	45½	34½	5	10½	1
	29. III. 1924	—	5	42	42½	6½	3	1
	31. III. 1924	—	3	42½	35½	2	17	—
C . . . s.	4. IV. 1924	—	4	64	17	3	12	—
	10. IV. 1924	—	4	61	23	7	5	—
	25. IV. 1924	—	5	32½	40½	4	17	1
	29. IV. 1924	—	4	42½	42	1½	10	—
B . . . k.	8. III. 1924	—	5	47	25½	8½	13	—
	10. III. 1924	—	7	64	20	2	7	—
	12. III. 1924	—	5	40	34½	12	8½	—
	15. III. 1924	1	3½	46	37	8	4½	—
	24. III. 1924	—	3½	41½	29½	9½	16	—
B . . . n.	9. III. 1924	—	2	37½	46½	2	12	—
	10. III. 1924	—	2	30	56	2	10	—
	12. III. 1924	—	4	40	40	3½	12	½
	14. III. 1924	—	2	40½	31½	6	19½	½
	19. III. 7924	1	5	47½	30½	3	13	—
	26. III. 1924	—	1	39	44	3	13	—
E . . . s.	9. VI. 1924	—	4	52½	31½	1	12	—
	16. VI. 1924	—	5	53½	29	4	8½	—
	21. VI. 1924	—	3	53	31	4	9	—
Herr T . . . m.	12. III. 1924	—	½	36	50	1½	11½	½
	19. III. 1924	—	2	42	37	2½	14½	—
	27. III. 1924	½	2	46	34½	1½	14½	1

Irgendwelche Schlüsse über die Einwirkung der Tollwutschutzimpfung auf den Organismus oder gar die Prognose der Impfung können wir aus den von uns mit dem Blutbild gemachten Erfahrungen nicht ziehen.

Die Messung des *Blutdrucks* ergab keine nennenswerte Abweichung von der Norm. Jedenfalls konnte irgendein Einfluß der Schutzimpfung nicht festgestellt werden.

Unter den sonstigen Komplikationen spielen die rein *örtlichen Erscheinungen an der Impfstelle* eine gewisse Rolle. Manche Beobachtungen dürften wohl durch einen nicht einwandfreien Impfstoff zu erklären sein, so wenn *Pribram* und *Pulay* noch 1916 darüber berichten, daß sie 7 mal ein ausgedehntes Erythem und 8 mal eine phlegmonöse Entzündung der Bauchseite bei ihren Impfungen bekamen, Erscheinungen, die weit über einfache eiweißtoxische Reaktionen hinausgingen. Auch *Adelheim* sah derartige Hautveränderungen mit teigigen Ödemen des subcutanen Gewebes große Ausdehnung annehmen. Der uns vom Berliner Institut überwiesene Impfstoff wurde in unserer bakteriologischen Abteilung regelmäßig noch einmal untersucht, stets steril befunden und unter allen Kautelen der Asepsis verdünnt. Wir glauben daher, daß die von uns beobachteten lokalen Reaktionen lediglich als Überempfindlichkeit gegen die organischen Impfstoffsubstanzen aufgefaßt werden müssen. Wir beobachteten derartige Reaktionen in 48 Fällen. Es handelte sich um das Auftreten einer umschriebenen diffusen Hautrötung mit Infiltration des Unterhautzellgewebes, die in ihrer äußersten Ausdehnung etwa Kleinhandtellergröße erreichte. Die Rötung hielt durchschnittlich 2—3 Tage an, verschwand dann ohne Zurücklassen irgendwelcher Hautveränderungen. Sie trat nach der

1. Injektion	1 mal		11. Injektion	2 mal
3. „	3 „		12. „	2 „
6. „	7 „		13. „	3 „
7. „	22 „	(erste große Injektion)	14. „	2 „
8. „	11 „		16. „	1 „
9. „	9 „		17. „	1 „
10. „	4 „		18. „	1 „

auf. Eine Wiederholung erheblicher Lokalreaktionen wurde in Einzelfällen mehrfach beobachtet; so fand sich eine

2 malige	Reaktion	in	20	Fällen
3 „	„	„	2	„
4 „	„	„	2	„
5 „	„	„	3	„
6 „	„	„	3	„
7 „	„	„	3	„

Ich habe den Eindruck, daß Neurotiker von der lokalen Reaktion besonders häufig befallen wurden. Bei häufigeren Lokalreaktionen

konnte auch eine Reaktion der regionären Lymphdrüsen festgestellt werden.

Allgemeinbeschwerden wurden in 64 Fällen beobachtet, und zwar handelte es sich um das Auftreten mehr minder heftiger *Kreuzschmerzen, allgemeiner Müdigkeit* und uncharakteristischer *Gliederschmerzen.* Oft nahmen diese allgemeinen Beschwerden einen erheblichen Grad an und dauerten mehrere Tage lang, in anderen Fällen traten sie nur ganz vorübergehend und kurzdauernd in Erscheinung, meist wurden sie an dem der ersten großen Injektion folgenden Tage, also dem 8. Impftage, gesehen. Bei Neuropathen waren natürlich diese Beschwerden erheblicher betont, hatten vielfach auch eine *depressive Stimmung* bei denselben im Gefolge.

Da es sich um eine aktive Immunisierungsmethode handelt, bei der sowohl lebendes Virus als auch artfremdes Eiweiß parenteral einverleibt wird, ist mit der Möglichkeit einer infektiösen oder toxischen *Nierenschädigung* durchaus zu rechnen. Unter den klinisch eingehend beobachteten Fällen wurde eine Eiweißtrübung in 16 Fällen vorübergehend beobachtet; einmal trat bei einem 15jährigen Knaben nach der ersten Injektion eine erhebliche Eiweißausscheidung mit deutlich nephrotischem Sedimentbefund auf, die am nächsten Tage bereits auch nicht mehr als Resterscheinung nachzuweisen war. Diese plötzlich auftretende und ebenso plötzlich verschwindende Albuminurie würde ich wegen ihrer Absonderlichkeit mit einem Fragezeichen versehen, wenn ich nicht selbst Gelegenheit gehabt hätte, den unter meinen Augen entleerten Blasenurin eingehend zu untersuchen. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um leichte febrile Albuminurie, ohne daß Nierenformbestandteile im Sediment nachweisbar werden; nur einmal konnten granulierte Cylinder noch außer in dem vorbeschriebenen Falle nachgewiesen werden. Auf den Sedimentbefund von Leukocyten in 9 Fällen, Leukocyten und Epithelien in ebenfalls 9 Fällen und Erythrocyten in 4 Fällen möchte ich keinen allzu großen Wert legen, da möglicherweise in einem Teil dieser Fälle ältere Blasenveränderungen vorlagen. Jedenfalls beweisen diese Befunde, daß man bei der Vornahme der Impfung unbedingt auf das Verhalten der Nieren achten muß.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten des *Nervensystems.* In der Mehrzahl der Fälle, in denen Störungen seitens des Nervensystems bereits vor Beginn der Impfung vorhanden waren bzw. während der Dauer der Impfung auftraten, handelt es sich, wie bereits oben erwähnt, um funktionelle Störungen mehr minder erheblicher Art bei Neuropathen. In einem Falle trat noch während der Impfung eine absolute Pupillenstarre auf, die erst nach längeren Wochen zurückging. Andere Symptome seitens des Nervensystems waren nicht nachzuweisen. Eine Lumbalpunktion war uns in diesem Falle nicht möglich. In 4 weiteren Fällen

traten nach Abschluß der Impfung heftige Kopfschmerzen auf, die sich noch über Monate hinaus bemerkbar machten. Symptome für eine organische Erkrankung des Zentralnervensystems waren nicht nachzuweisen. Die Lumbalpunktion ergab ein völlig negatives Resultat. Es ist selbstverständlich, daß in diesen Fällen auch die Nebenhöhlen spezialärztlich untersucht und gesund befunden wurden. Es ist in diesen Fällen sehr wohl mit der Möglichkeit zu rechnen, daß es sich um durch die Impfung gesetzte cerebrale Störungen handelte. Natürlich kann nicht entschieden werden, ob diese auf eine infektiöse oder neurotoxische Ursache zurückzuführen sind.

Unter besonderen *Nebenerscheinungen* der Impfung muß in vereinzelten Fällen gehäuftes *Nasenbluten* erwähnt werden, sowie das Auftreten eines *urticariellen Exanthems* in einem Fall 14 Tage nach Abschluß der Impfung, in einem anderen Fall 3 Wochen nach Abschluß der Impfung. Da in beiden Fällen eine weitere Ursache für das Auftreten der Urticaria nicht gefunden werden konnte, muß dieselbe wohl mit der Impfung in Zusammenhang gebracht werden. Da in beiden Fällen die Urticaria erst nach Abschluß der Impfung auftrat, ist anzunehmen, daß sie wohl häufiger vorkam, als es zu unserer Kenntnis kam, da die meisten Fälle zur Zeit des Auftretens der Hauterscheinungen nicht mehr in unserer Beobachtung waren. Erwähnt werden muß auch das nicht seltene Vorkommen *impetiginöser Ekzeme* meist geringeren Umfanges. In einem Falle sahen wir eine Scabies während der Impfung impetiginösen Charakter annehmen.

Eine *Exacerbation bestehender chronischer Krankheiten*, wie sie *Carnot* und *Gardin* beschrieben haben, haben wir an unserem Beobachtungsmaterial nicht gesehen, obwohl wir gerade darauf unser besonderes Augenmerk gerichtet haben. Vielleicht handelt es sich bei dem von *Carnot* und *Gardin* beobachteten Auftreten einer tuberkulösen Meningitis während der Dauer der Impfung doch nur um ein zufälliges zeitliches Zusammentreffen, nicht aber um einen ursächlichen Zusammenhang.

Zum Schluß möge der einzige Fall von Tollwut, den wir bisher zu beobachten Gelegenheit hatten, wegen seiner Besonderheiten beschrieben werden:

Es handelte sich um einen 50jährigen Wächter (Wilhelm W..., Akten-Nr. 2617/25), der bis dahin keinerlei wesentliche Erkrankungen überstanden hatte. Derselbe wurde von einem sicher tollwütigen Hunde an der rechten Wange verletzt. Es wurden dabei in der Nähe der Nasolabialfalte und in der Gegend des Kieferwinkels einige kleine Verletzungen gesetzt. Der Patient kam am 3. Tage nach der Verletzung zu uns zur Impfung. Am 17. Impftage, also am 20. Tage nach erfolgter Verletzung klagte er dem die Impfung durchführenden Assistenten über allgemeines Unbehaglichkeitsgefühl und ziehende Schmerzen in der Brust. Da ein organischer

Befund nicht erhoben werden konnte, auch der Kranke zur sofortigen Aufnahme ins Krankenhaus nicht zu bewegen war, wurde er mit der Anweisung entlassen, bei Verschlimmerung sofort das Krankenhaus aufzusuchen. Erst nach 2 weiteren Tagen kam er dann in schwerkrankem Zustande zur klinischen Behandlung. Er hatte dauerndes Erbrechen, Schlingbeschwerden und Parästhesien der Extremitäten.

Die klinische Untersuchung hatte folgendes Ergebnis:

Bei der Krankenhausaufnahme am 16. V. 1925 machte W. einen schwerkranken Eindruck, zeigte verfallenen Zustand, mühsame Atmung. Die Gesichtszüge waren schmerzhaft verzogen. Die Pupillen reagierten gut auf Licht und Konvergenz. Die Zunge war feucht, grauweiß belegt. Auf der rechten Tonsille ein kleiner grauer Belag.

Lungen und Herz zeigten keine Besonderheiten (Blutdruck 115/75 mg Hg). Der Bauch war etwas aufgetrieben. Milz und Leber waren nicht perkuttorisch vergrößert, nicht palpabel.

Die grobe Kraft in beiden Armen war herabgesetzt. Die Reflexe zeigten keine Störungen.

Die Temperatur lag zwischen 39 und 40° C, die Pulsfrequenz zwischen 100 und 120. Im Blutbild fanden sich 18 000 Leukocyten, darunter 9% stabkernige, 62% segmentkernige, 21% Lymphocyten, 7% Mononucleäre, 1% Mastzellen. Die Lumbalpunktion ergab einen Druck von 125 mm. Der Liquor war leicht trübe. Nonne und Pandy waren +. Die Zellzahl betrug 423/3. Es handelte sich um vorwiegend polynucleäre leukocytäre Elemente. Im Urin fand sich eine leichte Eiweißtrübung bei einem spez. Gew. von 1020.

Am nächsten Tage nahm die Unruhe des Patienten zu. Er hatte Widerwillen gegen Nahrungsaufnahme, insbesondere gegen Flüssigkeit, kämpfte dauernd mit Erbrechen bei Flüssigkeitszufuhr. Beim Anreden oder beim Eintritt fremder Personen ins Krankenzimmer schreckte er heftig zusammen, sonst liegt er ziemlich unbeweglich da. Die neurologische Untersuchung ergibt eine etwas trägere Pupillenreaktion und eine leichte Parese nicht nur der Arme, sondern auch der Beine. Im Laufe des Tages stellte sich eine zunehmende Salivation ein. Gegen Abend tritt, nachdem der Kranke kurz zuvor bei der ärztlichen Visite einen nicht wesentlich schwereren Krankheitseindruck gemacht hatte, plötzlich der Tod ein.

Während der Dauer der Impfung wurde eine Überempfindlichkeit der Bauchhaut beobachtet. Es bildete sich nach fast jeder Injektion ein entzündliches Ödem an der Injektionsstelle. Das Blutbild betrug am ersten Tage der Impfung 7800 Leukocyten, 2,5% stabkernige, 47,5% segmentkernige, 31% Lymphocyten, 4% Eosinophile, 13% Mononucleäre und 1,5% Mastzellen; am 10. Tage der Impfung 13 000 Leukocyten, 4% stabkernige, 58,5% segmentkernige, 18,5% Lymphocyten, 2% Eosinophile, 17% Mononucleäre.

Im Urinsediment fanden sich von Anfang an neben einer leichten Trübung Leukocyten, Epithelien und vereinzelte Erythrocyten.

Die nachträglich seitens der Tochter erhobene Anamnese ergab, daß W. bereits 5—6 Tage vor seiner Erkrankung eine auffallende Wesensänderung gezeigt habe, er habe eigentümlich ruhig oft stundenlang gesessen und vor sich hingestarrt, habe hin und wieder auch über Schmerzen in der Brust geklagt.

Die pathologisch-anatomische Untersuchung führte der Oberarzt unserer pathologisch-anatomischen Abteilung, Herr Dr. *Gerlach*, aus. Sein Befund lautet wie folgt:

Die Sektion (S. 464/25) ergab eine diffuse, stellenweise hämorrhagische Myelo-Encephalitis mit völliger Erweichung des Lendenmarks, Blutungen auf dem Boden des 4. Ventrikels, Hyperämie und Ödem des ganzen Gehirns und der weichen Hirnhäute. In den Lungen fanden sich infarktartige Blutungen, im ganzen Körper

nur flüssiges Blut, die abdominalen Organe waren cyanotisch, die Milz in geringem Maße weich geschwollen.

Mikroskopisch fand sich im Rückenmark eine schwerste Myelitis, die sich in der Hauptsache an die graue Substanz hielt. Sie bestand in einer diffusen Zelldurchsetzung mit Lymphocyten und Leukocyten, sowie massenhaften perivasculären und pericellulären Zellanhäufungen. Hier standen neben adventitiellen Elementen und Trabantzellen auch Leukocyten weitaus im Vordergrund. Die Ganglienzellen zeigten alle Bilder der Degeneration bis zu völligem Zelluntergang. Die entzündlichen Veränderungen gingen auf den Hirnstamm und die Stammganglien über, waren aber hier geringer. Negrische Körperchen wurden weder im Ammonshorn noch an sonstigen Stellen des Gehirns oder Rückenmarks gefunden.

Die Untersuchung des an der Leiche gewonnenen Materials auf Lyssavirus führte der Obertierarzt des hiesigen Veterinärwesens, Herr Dr. *Nieberle*, aus. Das Ergebnis der Untersuchung war nach seiner Mitteilung folgendes:

Bei der histologischen Untersuchung des Ammonshorns des W. konnten nirgends Negrische Körperchen nachgewiesen werden. Es mußte daher zum Impfversuch geschritten werden.

Geimpft wurden am 18. V. zwei Kaninchen (K 1 und K 2) und zwei Meerschweinchen (M 1 und M 2), und zwar intramuskulär.

M 1 ging am 24. V. ein. Es zeigte bei der Sektion ein hochgradiges, diffuses entzündliches Ödem der ganzen Unterhaut. Mikroskopisch ließen sich im Gehirn Negrische Körperchen nicht auffinden. Zwei mit verlängertem Mark weiter geimpfte Meerschweinchen sind nicht erkrankt.

K 1 zeigte am 1. VI. charakteristische Lähmung der Hinterhand, die Lähmung griff in den nächsten Tagen weiter um sich, und in der Nacht vom 4. auf den 5. VI. verendete das Tier unter allgemeinen Lähmungserscheinungen. An der Impfstelle zeigte sich bei der Sektion nur eine ganz leichte Infiltration, die Blase war auffallend stark mit Harn angefüllt. Histologisch konnten in den Ganglienzellen des Ammonshorns eine größere Anzahl typischer Negrischer Körperchen mit deutlichen Innenformationen nachgewiesen werden. Mit dem verlängerten Mark wurden am 6. VI. zwei Kaninchen (K 3 und K 4) intramuskulär weiter geimpft.

K 2 erkrankte am 8. VI. an Lähmung der Hinterhand und ging am 10. VI. unter allgemeinen Lähmungserscheinungen ein. Bei der sofort vorgenommenen Sektion fand sich an der Impfstelle keine Reaktion mehr, die Blase war auch in diesem Falle hochgradig mit Harn angefüllt. Bei der histologischen Untersuchung des Ammonshorns konnten wiederum in den Ganglienzellen eine größere Anzahl typischer Negrischer Körperchen nachgewiesen werden. Die Negrischen Körperchen saßen zum Teil in den Zellen der sog. „Bucht", besonders zahlreich aber am gegenüberliegenden Ende des Pyramidenzellenzuges. Sie zeigten die beim Kaninchen gewöhnliche Größe und wiesen deutliche Innenkörperchen auf.

M 2 lag am 14. VI. tot im Stall. Es hatte einen Tag nicht gefressen, jedoch keine Lähmungs- oder sonstigen auffälligen Erscheinungen gezeigt. Bei der histologischen Untersuchung des Ammonshorns ließen sich in den Ganglienzellen ungemein zahlreiche und teilweise auffallend große Negrische Körperchen mit charakteristischen Innenformationen nachweisen.

K 3 erkrankte am 20. VI. an allgemeiner Lähmung. Bei der Sektion fand sich wieder eine mächtige Blasenfüllung. Mikroskopisch konnten in den Ganglienzellen des Ammonshorns zahlreiche kleinere Negrische Körperchen mit charakteristischen Innenkörperchen aufgefunden werden.

Mit verlängertem Mark von K 3 wurde eine Katze weitergeimpft.

Die *Katze* erkrankte am 6. VI. an den Zeichen der rasenden Wut und verendete am 10. VII. 1925. In den Ganglienzellen des Ammonshorns ließen sich zahlreiche Negrische Körperchen nachweisen.

Es ließ sich mithin mit Hirnteilen des W. bei verschiedenen Tierarten und in mehreren Passagen Tollwut erzeugen. Die Inkubationsfrist bei den geimpften Tieren war sehr verschieden und durchweg viel länger als bei Passagewut (Impfung mit Virus fixe). Sie schwankte zwischen 14 und 27 Tagen. In jedem Fall ließen sich typische Negrische Körperchen im Ammonshorn der geimpften Tiere nachweisen, dagegen wurden stets die sog. Passagewutkörperchen vermißt.

Mithin lag bei W. Straßenwut und keine Passagewut vor.

Es handelt sich im vorliegenden Falle um eine klinisch und pathologisch-anatomisch einwandfreie atypische Lyssa, die auf Grund des Ergebnisses des Tierexperimentes als durch Straßenvirus erzeugt angesehen werden muß. Wenn die Erkrankung in so kurzer Zeit zum Ausbruch kam, so ist das bedingt einmal durch die besondere, auch im Tierexperiment nachgewiesene Virulenz des von dem wutkranken Tiere übertragenen Infektionsstoffes, sowie durch den Sitz der Verletzung im Gesicht, der als gefährlichste Bißstelle bekannten Körpergegend. Es bleibt natürlich die Frage offen, ob die Schutzimpfung für den atypischen Verlauf der Erkrankung mit verantwortlich gemacht werden kann.

Eine recht umfassende Zusammenstellung aller bisher vorgekommenen atypischen Lyssafälle sowohl, als auch der von den einzelnen Autoren geäußerten Meinungen geben *Koritschoner* und *Schweinburg* in ihrer erst kürzlich erschienenen Arbeit. Ich verweise daher auf diese Mitteilung, sowie auf die jüngste Arbeit von *v. d. Hoven v. Genderen* und verzichte auf eine nochmalige Wiederholung der derzeitigen Auffassung der verschiedenen Autoren zur Frage der Ätiologie der atypischen Lyssa.

Wer Gelegenheit gehabt hat, einen Fall von atypischer Lyssa, wie den von uns beschriebenen, eingehend zu beobachten, und wer weiß, eine wie große Übung und Erfahrung zum Gelingen des tierexperimentellen Nachweises der Wuterreger gehört, der neigt zu der Auffassung, daß es sich nur um atypisch verlaufende, durch Straßenvirus hervorgerufene Erkrankungen handelt. Die Fälle, in denen Straßenvirus nicht nachgewiesen werden konnte, müßten dann eben als Versager bezeichnet werden, könnten aber nicht gegen die ätiologische Bedeutung des Straßenvirus verwendet werden. Offen bleibt natürlich die Frage, ob in solchen Fällen die Schutzimpfung den atypischen Verlauf der Lyssa verursacht, vielleicht dadurch, daß sie in bis jetzt noch unerklärlicher Weise den Organismus nicht immunisiert, sondern sensibilisiert. Als Voraussetzung dafür muß aber eine besondere Disposition des Individuums angenommen werden, denn sonst müßten wir derartige, während der Impfung auftretende atypisch verlaufende Fälle häufiger sehen, berechnet doch *Simon* die Häufigkeit der atypischen Lyssa nur auf 0,05% der Gesamtheit der Geimpften. Würden wir eine solche sensibilisierende Wirkung der Impfung auf besonders disponierte Personen annehmen, so würden sich auch die Resultate, die man in den verschiedenen Wutschutzstationen mit verschieden zusammengesetztem und in verschiedener Form appliziertem Virus fixe erhalten hat, erklären lassen.

Schlußfolgerungen:

Übersehen wir die von uns mit der Tollwutschutzimpfung gemachten Erfahrungen, so kommen wir zu folgenden Schlußsätzen:

1. Die Tollwutschutzimpfung ist keine für den Organismus indifferente Methode. Sie verläuft unter den klinischen Erscheinungen einer leichten Infektion; zu erheblicheren Störungen führt sie nur in seltenen Fällen. Die Störungen sind zeitlich von verschiedener Dauer. Bleibende Schädigungen werden, abgesehen vom Krankheitsbilde der atypischen Lyssa, nicht beobachtet.

2. Es ist nicht möglich, aus besonderen Symptomen ein Urteil zu gewinnen, wie die geimpfte Person die Schutzimpfung vertragen wird, insbesondere kann auf Grund des Blutbildes eine Richtlinie für die Prognose und eine etwaige Modifikation der Impfung nicht gewonnen werden.

3. Die Wutschutzimpfung sollte bei den ihr zweifellos anhaftenden Gefahren tunlichst unter klinischer Beobachtung durchgeführt werden. Die ambulante Durchführung der Schutzimpfung sollte nur in Anlehnung an ein Krankenhaus erfolgen, in dem alle Möglichkeiten einer eingehenden Untersuchung gegeben sind. Die erstmalige Untersuchung hat sich auf eine erschöpfende Anamnese und eingehende körperliche Untersuchung, die fortlaufende auf Temperatur, Puls, Blutdruck, Urin, sowie selbstverständlich auch auf den Gesamtorganismus zu erstrecken.

4. Bei den der Wutschutzimpfung anhaftenden Gefahren ist einer zu weit gehenden Dezentralisation zu widerraten. Die durch die Impfung für den Einzelnen entstehenden sozialen Schwierigkeiten sind durch Bereitstellung öffentlicher Mittel zu beheben.

5. Durch tierexperimentelle Untersuchungen wäre weit mehr als bisher die Frage zu klären, ob die zeitliche Dauer der Impfung nicht beschränkt werden kann.

6. Bei dem von uns beobachteten Fall von atypischer Lyssa handelt es sich um eine echte Lyssaerkrankung, bei der an einen Einfluß der Schutzimpfung auf den atypischen Verlauf gedacht wird, wenn auch ein Beweis dafür nicht erbracht werden kann.

Literaturverzeichnis.

Adelheim, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **89**. 1919. — *Bollinger*, von Ziemssens Handbuch der speziellen Pathologie und Therapie. Bd. III. — *Borger*, zit. bei *Remlinger*. — *Carnot* und *Gardin*, zit. bei *Remlinger*. — *v. d. Hoven v. Genderen*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 427. — *Koch, Josef*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen v. Kolle u. Wassermann 1913. Bd. VIII. — *Koritschoner* und *Schweinburg*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **42**, H. 3/4. 1925. — *Kraus, R.*, Wien. klin. Wochenschr. 1924, Nr. 27. — *Pribram* und *Pulay*, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie **18**. 1916. — *Remlinger*, Ann. de l'inst. Pasteur à Tunis 1924. — *Schweinburg*, Wien. klin. Wochenschr. 1924, Nr. 33 u. 42. — *Simon*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. **65**—**68**. — *Thamhayn*, Schmidts Jahrb. **101**. 1859.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. — Direktor: Geheimrat Prof. Dr. *M. Hahn.*)

Über Bakterienzählung und -größenmessung in Aufschwemmungen (insbesondere Vaccinen) mittels des Kleinmannschen Nephelometers.

Von
Süssmann Muntner,

Mit 1 Textabbildung.

Für eine große Anzahl experimentell bakteriologischer Arbeiten, in neuerer Zeit für die zunehmende Vaccinetherapie, ist es notwendig geworden, eine möglichst genaue und verläßliche, aber auch nicht zu umständliche Methode der *Bakterienzählung* zu besitzen. Die bisherigen quantitativen Methoden sind zumeist derart ungenau, daß ein geringer Fehler der Methodik schon falsche Angaben von weit über 100% zu liefern imstande ist. Die Prinzipien, die bisher verwendet wurden, beruhen in der Hauptsache auf: *1. Auszählung der Bakterien in Kammern verschiedener Konstruktion, 2. Wägung der gesamten Bakterienmenge*[1]) *bzw. Rechnung nach Oesen, 3. Auszählung der lebenden Keime durch Plattenkultur, 4. Vergleich der Trübung von Bakterienaufschwemmungen gegenüber einer Standardprobe im durchfallenden Licht*[2]), *5. Bestimmung des Gesamtkubikinhalts der Bakterien durch Sedimentierung*[3]), *6. Vergleich von Bakteriengemischen mit roten Blutkörperchen in der Volumeneinheit* (*Wright*).

Die für Vaccinen praktisch am häufigsten angewandte und bei sorgfältiger Ausführung, namentlich wiederholter Zählung durch mehrere Personen relativ genaueste Methode ist diejenige der Zählung in der *Thoma-Zeissschen*, *Liebreichschen* oder *Bürkerschen* Zählkammer, analog derjenigen der Blutkörperchen. Viel verwandt wird auch die Methode

---

[1]) *Bugwid*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **77**. 1916.

[2]) Nach der für grobe Messungen annähernd ausreichenden Methode nach *Dold* mit dem *Turbidometer*. Münch. med. Wochenschr. Jg. 72. 1925.

[3]) *Olav Skar*, Milchwirtschaftl. Zentralbl. 1912 u. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2 **57**, 327ff. 1922.

der Durchsichtigkeitsbestimmung und der Vergleich mit Standardaufschwemmungen. Die auf letzterem Prinzip aufgebaute Transparenz-Methode von *Wright* und *Leishman*[1]) ist kaum noch im Gebrauch; mehr schon der von *Mohrmann* konstruierte Apparat und die von *Ungermann*[2]) hergestellten „Musteremulsionen" (10 proz. Lösung trocknen Kanadabalsams in Benzol mit Alcoh. abs.). Diese Art ist zu grobschätzungsweisen Durchschnittsvergleichen von Impfstoffen schon geeignet, doch kann sie niemals schärferen Anforderungen an Exaktheit entsprechen (*Neisser*), da die Transparenz nicht allein von der Keimzahl, sondern auch von der Größe der Bakterien, dem Farbton und der Lichtquelle abhängig ist. Diese Methode der Untersuchung im durchfallenden Licht ist derjenigen der Colorimetrie ganz nachgebildet.

In neuerer Zeit hat man solche Trübungen nicht mittels des durchfallenden, sondern quantitativ ziemlich genau mittels des *abgebeugten auffallenden* Lichtes (*Tyndallicht*) gemessen, zu welchem Zwecke besondere „*Tyndallmeter*" und „*Nephelometer*" verwendet werden. Die Anwendung dieser Methode basiert auf der Annahme, daß der Trübungseffekt entweder der Gewichtsmenge der trübenden Substanz proportional sei, oder, in einem bestimmten Größenbereich, z. B. dem der Bakterien, *proportional der Zahl und dem Quadrate des Radius* der Teilchen sei. Diese letztere Annahme haben *von Angerer*[3]) und nach ihm *R. C. Tolman*[4]) u. a. auf Grund experimenteller Erfahrungen ausgesprochen. In der modernen Nephelometrie — das sei noch einmal vorausgeschickt — wird *nicht die Trübung einer Lösung bei durchfallendem Licht, sondern die Lichtstärke des senkrecht zum Lichtkegel beobachteten Beugungslichtes*, des Tyndallichtes, zur Messung verwertet.

Das in Abb. 1 schematisch abgebildete *Nephelometer*[5]) nach *Kleinmann*, das von mir benutzt wurde, besteht im wesentlichen aus einem Stativ, an welchem auf der Rückseite zwei analoge Schienen und Schlitten angebracht sind. Die Schlitten tragen zwei zylindrische Metallhohlkörper, die an der Seite mit Spiralen versehen sind. In die Hohlzylinder passen zwei kleine Reagensgläschen, die aus sehr feinem schlierenfreiem Glas gearbeitet sind und mittels einer Federung hoch- und heruntergeschoben und in jeder gegebenen Höhe festgehalten werden können. Durch an beiden Seiten angebrachte Schrauben können zwei

---

[1]) *Wright-Leishman*, im Handbuch Kraus-Levatidi. Bd. I. Jena 1908.

[2]) *Ungermann*, Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte 1917, S. 50 u. Veröff. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte 1899, S. 108.

[3]) *v. Angerer*, Über das optische Verhalten von Bakterien. Arch. f. Hyg. **93**, 19ff. 1923.

[4]) Journ. of Americ. chem. soc. **41**, 575.

[5]) Alle näheren Einzelheiten über diesen Apparat sind bei *H. Kleinmann*, Colorimetrie und Nephelometrie im biochemischen Laboratorium (Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden v. *Abderhalden*) nachzulesen.

Fensteröffnungen (a_1 und a_2) beliebig vergrößert und verkleinert bzw. ganz verschlossen werden. Mit dem Fensterverschluß steht beiderseits ein Noniuswerk in Verbindung, das die jeweilige Fensteröffnung genau an-anzeigt. Von vorn her fallen durch diese Fenster (senkrecht zur Rückseite der Zeichenebene) Lichtstrahlen auf die mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllten Röhrchen, in welchen entsprechende Tyndallkegel entstehen. Diese Tyndallkegel werden nun durch eine besondere Optik senkrecht zur Einfallsachse, also von oben her, beobachtet. Und zwar geht das in den hochgeschobenen Reagensgläschen abgebeugte Licht durch zwei beim Hochschieben in die Gläschen eintauchende massive Glaszylinder, die optisch völlig gleich, hintereinander aus demselben Stück der Glasmasse geschnitten sind. Sie dienen vor allem zu dem Zweck, den Fehler, welcher durch bloße Beobachtung der Oberfläche entsteht, zu vermeiden und um zentrales Licht zu entnehmen. Die Lichtstrahlen wandern durch eine Optik in ein zweigeteiltes Gesichtsfeld, ähnlich dem der *Polarisationsapparate*, und werden durch ein Okular beobachtet. Die Höhen der dem Licht ausgesetzten Gefäße können, wie beschrieben, durch einen Trieb beliebig und meßbar geändert werden. Dies geschieht so lange, bis im Okular die beiden Gesichtshälften gleich hell erscheinen.

Zur Beleuchtung des Apparates wählt man zweckmäßig eine möglichst vielkerzige Birne, die senkrecht vor dem Apparate in einer auszuprobierenden optimalen Entfernung (meist $^3/_4$ m, weil dann die Lichtstrahlen fast parallel einfallen) und in gleicher Höhe mit den Fenstern des Nephelometers aufgestellt wird. Hat man sich nun überzeugt, daß die Beleuchtungsquelle symmetrisch zu den beleuchteten Zylindern, die Lichtstrahlen parallel einfallen und damit das Gleichgewicht des Apparates hergestellt ist, was daraus hervorgeht, daß beide Zylinder, mit der gleichen trüben Lösung gefüllt, rechts und links nach Einstellung auf gleiche Fensteröffnung dieselbe Helligkeit auch nach Vertauschen der beiden Zylinder bestehen bleibt, so ist der Apparat gebrauchsfertig. Nur dann nämlich ist das Verhältnis der Fensterhöhen umgekehrt proportional den Konzentrationen.

Schon andere Autoren haben den Versuch gemacht, auf optisch-nephelometrischem Wege die Keimzahl der Bakterien zu bestimmen. So stellte *Heckscher*[1]) eine Normalaufschwemmung von Colibacillen her, die er in Formol aufbewahrte und die sich nach seinen Angaben einige Monate auf der gleichen Trübung hielt, wenn er sie vor Gebrauch jedesmal ordentlich schüttelte. Mit dieser Aufschwemmungstrübung verglich er neu hergestellte Aufschwemmungen in einem Instrumente, das eine Mittelstellung zwischen *Colorimeter* und *Nephelometer* einnimmt.

[1]) *Heckscher*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 85, 378.

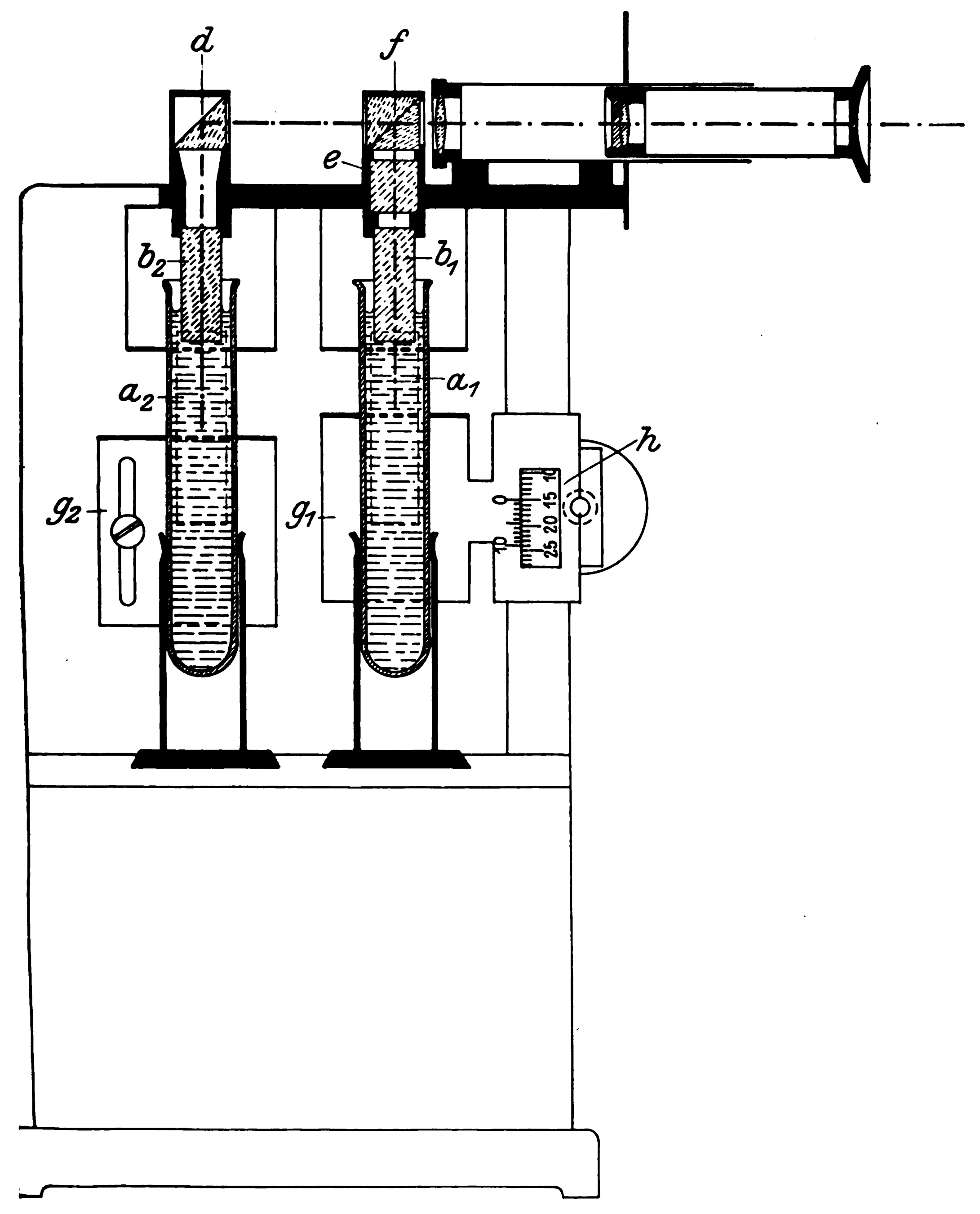


Abb. 1. Schematische Darstellung des Nephelometers *(Kleinmann)*.

H. Bechhold und *F. Hebler*[1]) haben für den Bereich kolloider Dispersionen gezeigt, in wiefern der Trübungsgrad von der Teilchengröße abhängig ist und fanden, daß die Trübung bei gleichbleibender Anzahl und zunehmender Dispersität der Teilchen (von 2,5 μ bis 0,8 μ) zunimmt; bei fortschreitender Dispersität (800 $\mu\mu$ bis 4 $\mu\mu$) nimmt die Trübung wieder rapide ab. Das Maximum der Trübung für weißes Licht liegt also bei der Teilchengröße von 800 $\mu\mu$, dem Bereich der äußersten Wellenlänge für rote Lichtstrahlen. Sie konnten also von 800 $\mu\mu$ abwärts das Rayleighsche Gesetz

$$T = \frac{n \cdot r^2}{\lambda^4} \cdot K \quad ^{2)}$$

bestätigen, wobei der Teilchendurchmesser kleiner sein muß als die Wellenlänge des abgebeugten Lichtes. Dieses Gesetz konnte auch *Mecklenburg*[3]) mit seinem fein konstruierten *Tyndallmeter* bestätigen, allerdings nur für Dispersionen von 150 bis 5 $\mu\mu$; für disperse Systeme von 800 bis 150 $\mu\mu$ gilt nach seinen Angaben das Clausiussche Gesetz:

$$T = \frac{n \cdot r^2}{\lambda^2} \cdot K\,.$$

Es war also *Bechhold* und *Hebler* möglich, auf Grund dieses Gesetzes bei gleichbleibender Anzahl, außerdem gleicher Lichtqualität und -Intensität den Dispersitätsgrad und damit die Größe der Teilchen zu bestimmen. Aus dem Vorhergehenden ergibt sich, daß das Rayleighsche Gesetz für die Größenordnung der Bakterien nicht zutrifft. Für den Bereich der Bakteriengrößenordnung hat vielmehr *v. Angerer*[4]) experimentell bewiesen, daß Bakterien, gleiche Anzahl in der Volumeneinheit vorausgesetzt, *proportional dem Quadrate ihres Durchmessers* trüben. Gleichzeitig aber fand er auch, daß bei nicht sehr stark konzentrierten Suspensionen die Trübung der *Zahl der trübenden Teilchen*, gleiche Größe vorausgesetzt, ebenfalls *proportional* ist. Aus seinen Untersuchungen resultiert also die Gleichung:

$$T = n \cdot D^2 \cdot K\,,$$

wobei T = Helligkeit, n = Teilchenzahl, D = Teilchendurchmesser und K eine Konstante, der Lichtbrechungsindex (bei Bakterien ca.

---

[1]) *H. Bechhold* und *F. Hebler*, Der Nephelometereffekt kolloider Systeme von verschiedener Teilchengröße. Kolloid-Zeitschr. **31**, H. 2, S. 70—74 u. H. 3, S. 132.

[2]) Dabei ist T das abgebeugte Licht (Helligkeit) proportional der Anzahl (n) der in der Raumeinheit vorhandenen Teilchen und proportional dem Quadrate des Teilchenvolumens (v), ferner umgekehrt proportional der vierten Potenz der Wellenlänge (λ) des erregenden Lichtes.

[3]) *W. Mecklenburg*, Kolloid-Zeitschr. **14**, 172; **15**, 149 u. **16**, 97ff.

[4]) *v. Angerer*, l. c.

1,33—1,40) sind. Es ist danach also möglich, bei zwei Suspensionen gleicher Trübung, von denen bei beiden die Bakterienzahl pro Kubikzentimeter und von der einen außerdem noch die Teilchengröße bekannt ist, die Teilchengröße der zweiten Suspension zu ermitteln. Es muß ferner möglich sein, falls die Gleichung stimmt, die Anzahl der Teilchen (Bakterien) einer Suspension zu ermitteln, wenn der Radius und das Trübungsverhältnis zweier Suspensionen, schließlich die Anzahl der Teilchen der andern Suspension bekannt sind. In Fortführung dieser Gleichung wird es sogar möglich sein, wenn beide Trübungswerte, die Anzahl der einen und die Teilchengröße der anderen Suspension bekannt sind, bei letzterer die Anzahl und bei ersterer die Teilchengröße gleichzeitig zu berechnen.

Nach diesem Gesetz hatte *Walter Liese*[1]) schon im hygienischen Institut der Universität Berlin die Gesamtoberfläche von durch kugelförmige Bakterien getrübten Suspensionen berechnen und durch Nachmessung bestätigen können. Damit hatte er auch erneut einen Beweis für die Richtigkeit des *v. Angerer*schen Satzes liefern können.

Auf Anregung von Herrn *Geheimrat Hahn* bin ich nun darangegangen, auf nephelometrischem Wege die aus der *v. Angerer*schen Annahme sich ergebenden Formeln praktisch zur *Bakterienauszählung* oder *Größenmessung* oder *beider zugleich* zu verwerten. Von erheblichem Nutzen war mir dabei die von *H. Kleinmann*[2]) neuerdings beschriebene Methode der Herstellung eines praktisch unveränderlichen *Trübungsstandards*. Dieser ist den Standardproben mit Glykogen und den von *Bechhold* und *Hebler* und *Kraus*[3]) beschriebenen, mit Bariumsulfat, Calciumphosphat und -oxalat und Bleioleat oder Bleipalmitat, ferner dem kurzlebigen „Standardsole“ durch seine Einfachheit und Haltbarkeit weit überlegen.

Der neue Standard besteht aus einem Reagensgläschen, wie es sonst zur Aufnahme von Flüssigkeit für die nephelometrische Untersuchung benutzt wird, nur sind dessen Wände mattiert. Die Mattierung kann durch Einkleben eines Innenmantels aus verschieden gefärbtem Seidenpapier oder durch rasches Einfüllen und Ausgießen einer ätherischen Kollodiumsuspension mit einem weißen, feinkörnigen, indifferenten Pulver, z. B. Talkum, hergestellt werden. Unten ist das Röhrchen offen und trägt eine Metallfassung, in welche eine Metallpatrone paßt. Diese kann mit beliebig abstufbarem weißem oder gefärbtem Pulver gefüllt und eingeführt werden. Das Röhrchen wird so ohne Flüssigkeit ganz wie sonst in das Nephelometer eingeführt und hochgeschoben und

---

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, H. 3/4. 1926.

[2]) *Hans Kleinmann*, Weitere Beiträge zur Nephelometrieapparatur und der Methodik nephelometrischen Arbeitens. Biochem. Zeitschr. **137**, H. 1/3, S. 150ff.

[3]) Ein Trübungsstandard. Kolloid-Zeitschr. **31**, 132.

verursacht eine Lichtstärke, welche sowohl durch die Mattierung und Farbe des Bodenkörpers als auch durch die Stellung des Nephelometerfensters beeinflußbar ist. Man hat also auf diese Weise einen Trübungsstandard, welcher die Farbe jeder Trübung durch Änderung des Bodenkörper-Farbpulvers anzunehmen vermag. Da wir im Nephelometer im wesentlichen nur zwei verschiedene Lichtstärken zu vergleichen haben, so ist es klar, daß die Stärke des durch das Standardröhrchen gehenden Lichtes *beliebig beeinflußt* werden kann durch 1. *Mattierung des Röhrchens*, 2. *Beleuchtungsquelle*, 3. *Fensteröffnung*. Wenn man also den beliebig präparierten Dauerstandard aichen will, so muß man ermitteln (da ja Mattierung und Bodenfüllung konstant sind), welche Fenstergröße eingestellt werden muß, damit die Lichtstärke des Standards gleich wird der Lichtstärke einer Bakteriensuspension, in welcher durch Zählung und Messung die Anzahl und Größe der Teilchen bekannt sind.

Die praktische Ausführung der nephelometrischen Bakterienuntersuchung geht nun in der Weise vor sich:

Als Ort wählt man am besten eine Dunkelkammer, deren Wände schwarz angestrichen sind, um möglichst alle Lichtreflexe auszuschalten. Das Nephelometer wird auf einem nicht verrückbarem Tische aufgestellt und fixiert. In einer beliebigen Entfernung, direkt vor den Fenstern des Nephelometers, wird eine möglichst vielkerzige elektrische Lampe (mattierte Birne) ebenfalls fixiert. Die Entfernung und Lichtstärke der Birne ist nicht von besonderer Bedeutung, nur müssen zu vergleichenden Untersuchungen stets dieselbe Lichtart und -stärke und dieselbe Entfernung genommen werden. (In unserem Falle 300 Kerzen und 35 cm Entfernung.) Um genauere Messungen vornehmen zu können, empfiehlt es sich, vor den Fuß des Nephelometers, welcher schwarz lackiert ist, bis zur Höhe des Fensters einen Schirm anzubringen, um das störende, vom lackierten Fuß reflektierte Licht auszuschalten.

In den linken Schlitten des Nephelometers wird das in Farbton und Helligkeit präparierte Standardtrübungsröhrchen eingeführt, hochgezogen, bis es an den Kopf des Nephelometers anstößt, und durch am Röhrchen sowohl als auch am Schlitten befindliche Marken stets in einer bestimmten Stellung fixiert. Zur Erzielung des Standards wird eine Bakterienaufschwemmung, von der durch vorangegangene Messung und Zählung sowohl die Größe als auch die Anzahl der Einzelbakterien bekannt sind, in ein sorgfältig gesäubertes Nephelometerröhrchen gegossen, dieses wird in den rechten Schlitten eingeführt und hochgeschoben. (Vorsicht, daß beim Eintauchen des Zylinderkrystalles nichts von der Aufschwemmung überfließt — Reflexe, Infektionsgefahr!) Als Ausgangsaufschwemmung nimmt man am besten eine solche, die eine

möglichst runde Keimzahl und eine möglichst runde Radiuszahl enthält. Wir haben eine Staphylokokkenaufschwemmung mit einem Teilchenradius von 0,5 μ und einer Keimzahl von 200 Millionen pro Kubikzentimeter als Ausgangslösung benutzt.

Die Aufschwemmung wurde folgendermaßen hergestellt. Ein auf Agar gezüchteter Staphylokokkenstamm wurde in der üblichen Weise mit einer physiologischen Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Bakteriensuspension enthielt noch gröbere Bakterienballen trotz längeren Schüttelns. Zum Zwecke der Befreiung von größeren Klumpen und unvermeidlicher Beimengung von Staub, Watte und anderen Schmutzpartikeln wurde die Suspension durch ein chemisch quantitatives Filter (Schleicher u. Schüll Nr. 556) geschickt, welches noch Partikel von 1,7 bis 2,0 μ Größe hindurchläßt. Der Suspension wurde nun 0,5 proz. Carbol hinzugegeben, welches die Bakterien abtötet aber nicht hydratisiert und keine merkliche Eigentrübung verursacht (aus dem letzten Grunde empfiehlt es sich nicht, Formol oder Lysoform usw. zur Abtötung zu verwenden). Nun wurde mittels Okular- und Objektivmikrometer der Durchmesser bzw. Radius der Kokken bestimmt. Der Radius war 0,5 μ. Eine durch mehrere geübte Personen vorgenommene Zählung der Suspension ergab 600 Millionen pro Kubikzentimeter. In ähnlicher Weise wurden später noch andere Bakterienstämme untersucht. Durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wurden nun verschiedene Verdünnungen hergestellt.

Wir nehmen eine Verdünnung 1 : 3 mit 200 Millionen Staphylokokken als Ausgangslösung. Beim Vergleich im Nephelometer mit dem Standardtrübungsröhrchen, welches denselben (bläulichen) Farbton wie die Suspension hatte und auf 5,0 stand, ergab sich rechts die Zahl 6,2. Setzen wir diese Zahlen in die obige Formel, $T = n \,.\, D^2 k$, ein, so ergibt sich

$$6{,}2 = 200 \cdot 1{,}0^2 \cdot K\,.$$

Schüttet man nun in das rechte Röhrchen eine Aufschwemmung, in welcher 400 Millionen Bakterien enthalten sind, so ergibt sich bei unveränderter Stellung des linken Röhrchens auf 5,0 rechts die Zahl 3,2. Hätten wir nicht schon vorher die Keimzahl dieser Suspension gekannt, so hätten wir sie jetzt aus der gefundenen Trübungszahl errechnen können. Es verhält sich nämlich:

$$\frac{x}{200\text{ Millionen}} = \frac{6{,}2}{3{,}2}\,; \qquad x = 388\text{ Millionen.}$$

Beim nephelometrischen Messen ist also eine Ungenauigkeit von 12 Millionen Unterschied entstanden, die bei den verschiedenen Fehlermöglichkeiten während der Verdünnung und Einfüllung in das Röhrchen zustande gekommen sein mag. Bei Einfüllung der ursprünglich hergestellten Suspension von 600 Millionen wurde rechts 2,1 abgelesen. Beim Einfüllen von 100 Millionen zeigte der Nonius rechts 12,4; bei 50 Millionen 23,8, bei 25 Millionen 46,9. Stets blieb das linke Standardröhrchen auf 5,0 stehen. Die Werte, die sich bei dieser nephelometrischen, *relativen Zählmethode* ergaben, sind:

Tabelle 1.

Nr.	Linke Skala	Rechte Skala	Nephelometrisch berechnete Keimzahl	Laut Verdünnung müßten enthalten sein	Fehler in Proz.
1	5	2,1	590 Millionen	600,0 Millionen	— 0,6
2	5	2,4	517 ,,	500,0 ,,	+ 3,5
3	5	3,2	388 ,,	400,0 ,,	— 3
4	5	6,2	200* ,,	200,0 ,,	—
5	5	12,4	100 ,,	100,0 ,,	—
6	5	17,0	73 ,,	75,0 ,,	— 2,5
7	5	23,8	52 ,,	50,0 ,,	+ 4
8	5	33,0	37,5 ,,	37,5 ,,	—
9	5	46,9	26,5 ,,	25,0 ,,	+ 6

* Empirisch festgestellt durch mehrmalige genaueste Auszählung seitens 3 Personen und davon ausgegangen.

Das Bereich der nephelometrisch am besten zu bestimmenden Anzahl einer Bakteriensuspension von 0,5—1 μ Radiusgröße erstreckt über die Zahlen 1 Milliarde bis 20 Millionen Keime pro Kubikzentimeter. Hat man Aufschwemmungen, die konzentrierter sind, also mehr als 1 Milliarde Keime pro Kubikzentimeter enthalten, so verdünnt man sie am besten. Aufschwemmungen, die weniger als 20 Millionen Keime pro Kubikzentimeter haben, sind der nephelometrischen Untersuchung kaum noch zugängig.

Zu bemerken ist, daß die hergestellten Verdünnungen nach 14 Tagen, nach 3 Wochen und nach 4 Wochen noch einmal gemessen wurden, es ergaben sich bei 600—100 Millionen fast genau dieselben Trübungszahlen, vorausgesetzt, daß vorher genügend aufgeschüttelt worden ist; nur von 100 Millionen abwärts ergaben sich von Mal zu Mal höhere Werte. Nach 8 Wochen ergaben die Suspensionen von 600—200 Millionen trotz tüchtigen Schüttelns statt:

Tabelle 2.

Nr.	Links	Früher rechts	Jetzt rechts	Frühere Anzahl	Jetzige Anzahl nephelometrisch	Jetzige Anzahl mit Zählkammer gezählt
1	5	2,1	2,5	600 Millionen	496 Millionen	420 Millionen
2	5	2,4	2,7	500 ,,	459 ,,	360 ,,
3	5	3,2	3,4	400 ,,	365 ,,	360 ,,
4	5	6,2	6,2	200 ,,	200 ,,	200 ,,
5	5	12,4	12,3	100 ,,	101 ,,	88 ,,
6	5	17,0	17,1	75 ,,	72 ,,	72 ,,
7	5	23,8	22,4	50 ,,	55 ,,	40 ,,
8	5	33,0	30,0	37,5 ,,	41,5 ,,	20 ,,
9	5	49,9	41,0	25 ,,	30,3 ,,	8 ,,

Es sind augenscheinlich in dieser Zeit die Bakterien z. T. durch Autolyse aufgelöst worden. Die scheinbare Zunahme der Bakterien von 200 Mil-

lionen abwärts ist wohl auf die Art der Aufbewahrung (Röhrchen mit Wattepfropf), also die Verdunstung, Zunahme von Staub und anderen Schmutzpartikeln, schließlich auf Scheinagglutinationen zurückzuführen.

Nach 10 Wochen wurde übrigens wieder eine geringe Abnahme der Bakterien festgestellt, welche sich bei verschiedenen Suspensionen verschieden verhielt. Die Teilchengröße war überall noch dieselbe. Durch die Autolyse, die man in der Kolloidchemie als Hydratation bezeichnen würde, geht nicht nur der Bakterienleib, sondern mit ihm auch die trübende Substanz verloren. Zum Zustandekommen einer Trübung gehört aber ein deutlicher Unterschied zwischen den Brechungsexponenten der dispersen Phase (in diesem Falle Bakterien) und des Dispersionsmittels ($NaCl \cdot 0{,}8\%$). Die oben für Staphylokokken aufgestellte Tabelle 1 konnte für mehrere Kokkenstämme ungefähr derselben Größenordnung verwendet werden. So übergab mir die Untersuchungsstation des Hygienischen Institutes Berlin mehrmals Vaccinen zum nephelometrischen Nachprüfen ihrer durch Auszählung gefundenen Keimzahl. Das eine Mal war es eine Staphylokokkenaufschwemmung, die wegen ihrer starken Trübung auf das Zehnfache verdünnt wurde. Nach Einfüllen und Einstellen in das Nephelometer ergab sich — bei unveränderter Lichtquelle und Intensität und bei unveränderter Stellung des Nephelometers und des Standardröhrchens links auf 5,0 rechts die Zahl 7,4. Nach der Formel, von der ich ausging (s. Tabelle 1, Nr. 4):

$$\frac{x}{200 \text{ Millionen}} = \frac{6{,}2}{7{,}4}\,; \quad x = 167{,}5 \text{ Millionen.}$$

Da die untersuchte Lösung den 10. Teil der Vaccine darstellte, enthielt die Vaccine 1,675 Milliarden Keime. Gezählt wurden von 3 Herren, unabhängig voneinander, 1,600, 2,000 und 1,640 Milliarden.

Ein anderes Mal handelte es sich um eine Gonokokkenvaccine von dem Teilchendurchmesser 0,33 μ. Die durch $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 60% abgetötete Vaccine wurde filtriert. Nach Einfüllen und Einstellen zeigte der rechte Nonius des Nephelometers 22,5; dies würde nach der obigen Berechnung 510 Millionen entsprechen[1]). Dreimal

[1]) Die Zahl 510 Millionen resultiert aus folgender Gleichung:

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{n_1 \cdot r_1^2}{n_2 \cdot r_2^2}\,.$$

Da nun das Verhältnis der Fensterhöhe zur Konzentration umgekehrt proportional ist, lauten die Zahlen, in die Gleichung eingesetzt (ausgehend von unserer in Tab. 1 notierten Standardtrübung — 200 Millionen Staphylokokken, Radius 0,5 = Wert rechts 6,2):

$$\frac{22{,}5}{6{,}2} = \frac{200 \cdot 1^2}{x \cdot 0{,}33^2}\,;$$

$$x = \frac{200 \cdot 1^2 \cdot 6{,}2}{22{,}5 \cdot 0{,}33^2}\,;$$

$$x = 510 \text{ Millionen.}$$

wiederholte voneinander unabhängige Zählungen ergaben 520, 480 und 600 Millionen.

Der neue Standard wurde von mir auch dazu benutzt, um, entsprechend der von *Liese* (s. o.) gebrauchten Methode, den Radius von Kokken zu bestimmen, der in diesem Falle ja für deren Größenbestimmung ausreicht. Zu diesem Zweck war es notwendig, vorher die Anzahl der Bakterien in der untersuchten Suspension pro Kubikzentimeter zu kennen. Wir nahmen Luftkokken, die auf Agar gezüchtet wurden, und stellten eine Suspension von 400 Millionen pro Kubikzentimeter her. Im Nephelometer zeigte diese Suspension bei feststehender Öffnung des linken Fensters auf 5, die Zahl 0,8 auf der rechten Seite. In unsere Standardformel eingesetzt lauten diese Zahlen:

$$\frac{0,8}{6,2} = \frac{200 \cdot 1^2}{400 \cdot x^2};$$

$$x^2 = \frac{200 \cdot 6,2}{400 \cdot 0,8};$$

$$x = \sqrt{\frac{200 \cdot 6,2}{400 \cdot 0,8}} = 1,97\ \mu .$$

Mit dem nach einem Objektivmikrometer geaichten Okularmikrometer haben wir die Kokken alsdann nachgemessen; sie hatten in der Tat einen Durchmesser von annähernd 2 μ. Dieselbe Suspension 1 : 2 (200) verdünnt ergab die Nephelometerwerte = 1,6; 1 : 4 (100) verdünnt = 3,2 und 1 : 8 (50 Millionen) verdünnt = 6,4.

In ähnlicher Weise wurden andere Aufschwemmungen untersucht (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3.

Bakterienart	Bekannte Anzahl	Nephelometertrieb		Durchmesser gemessen mit Mikrometer	Errechnet nach Nephelometer	Bemerkungen
		links	rechts	μ	μ	
Staphylokokken .	400 Millionen	5	3,2	1,0	—	(Ausgangs-
Luftkokken . .	400 ,,	5	0,8	2,0	1,97	suspension)
Gonokokken . .	400 ,,	5	29,4	0,33	0,33	
Pneumokokken .	400 ,,	5	3,2	1,0	1,0	
Streptokokken .	400 ,,	5	3,2	1,0	1,0	
Staphylokokken .	200 ,,	5	6,1	1,0	1,0	
Luftkokken . .	200 ,,	5	1,6	2,0	1,95	
Gonokokken . .	200 ,,	2,5 *	29,4	0,33	0,33	
Pneumokokken .	200 ,,	5	6,3	1,0	1,0 } ca.	
Streptokokken .	200 ,,	5	6,4	1,0	1,0 } ca.	

* Der rechte Trieb geht nur bis zur Zahl 48. Da bei dieser äußersten Zahl noch keine gleiche Helligkeit zu erzielen war, wurde der Trieb rechts auf der für 400 Millionen bekannten Zahl stehen gelassen (29,4) und der linke Trieb verschoben.

Wie fehlerhaft die bisher so oft angewandten Methoden der „Ösenrechnung“ und der Schätzung durch „Trübungsvergleich“ sind, ersieht man aus folgenden Resultaten, die wir bei Untersuchung fabrikatorisch von anderer Seite hergestellter Vaccine erhielten. Eine Staphylokokkensuspension sollte 15 Milliarden enthalten. Nephelometrisch und zählend — mehrere Herren unabhängig voneinander — erhielten wir die Durchschnittszahl von 2 Milliarden. Weder war an ein Eintrocknen und eine daraus resultierende Vermehrung der Keime zu denken, da das mit Gummipfropf verschlossene Fläschchen fast voll war, noch an eine in diesem Falle in Frage kommende Autolyse, da die Suspension erst ganz jungen Datums war. Ein anderes Mal erhielten wir aus derselben Quelle weitere vier hergestellte Vaccine, in NaCl und 0,5 proz. Karbolsäure suspendiert. Es handelte sich um Gonokokken, Streptokokken, Pneumokokken und Typhusbacillen. In allen vier Suspensionen sollten je 1 Milliarde Keime pro Kubikzentimeter enthalten sein. Die nephelometrische Untersuchung und der Durchschnitt dreier Zählungen ergab folgendes Bild:

Tabelle 4.

Bakterienart*	Nonius l.	Nonius r.	angeblich sollten sein (Millionen)	Nephelometrisch gezählt (Millionen)	Gezählt in Thoma-Zeiss Zählk. (Millionen)	Radius in μ	Bemerkungen
Staphylokokken . .	5	6,2	15 000	2000	2000	0,5	Zur nephelometrisch. Messung wurde eine Verdünnung 1 : 10 benutzt
Gonokokken . . .	5	48,0	1 000	237	180	0,17	
Streptokokken . .	5	7,2	1 000	160	160	0,5	
Pneumokokken . .	5	40,0	1 000	31	36	0,5	
Typhusbacillen . .	5	0,6	1 000	1150	1200	{ 0,5 2,0	Radius 0,5 μ Länge 2,0 μ

* Die Staphylo-, Strepto- und Pneumokokken hatten annähernd denselben Radius. Die Typhusbacillen sind nicht nach derselben Formel berechnet worden, sondern nach einem eigens für Typhus hergestellten, besonders geaichten Standard. Über die Berechnung der Anzahl der stäbchenförmigen Bakterien aus der Trübung folgt eine besondere Arbeit. Die Gonokokken wurden nach der Gleichung auf der vorigen Seite berechnet.

Schwieriger wird die Rechnung, wenn man Bakterien zu untersuchen bekommt, die in ihrer Größe von derjenigen der gewöhnlichen Kokken (ungefähr 0,4—0,6 μ Radius) weit abweichen, wie z. B. Bacillen, größere Kokken (Sarcine) und Pilze. Am besten ist es dann, den festen Trübungsstandard für jede Bakterienart, nach einmaliger genauer Auszählung mittels Zählkammer dadurch zu aichen, daß man, wie oben aus-

geführt, die Einstellung des Trübungsstandards für eine bestimmte Teilchenzahl der betreffenden Bakterienart ermittelt.

Eine Staphylokokkensuspension, deren Durchmesser annähernd 2 μ betrug und die wir nach sorgfältiger Filtrierung und Trennung der einzelnen Kokkengruppen mit 60 Millionen gezählt hatten, zeigte im Nephelometer bei denselben äußeren Umständen wie die vorigen Untersuchungen (links 5,0) rechts 5,8. Diese Zahl 5,8 hielten wir fest als diejenige, welche einer Kokkengröße von 2 μ Durchmesser und 60 Millionen Keimzahl entspricht. Ein Kollege stellte von dieser Suspension eine Verdünnung her und gab sie mir zur Untersuchung. Die nunmehr untersuchte Aufschwemmung zeigte die Zahl 21,4 am rechten Nonius. Nach der Rechnung

$$\frac{X}{60\,\text{Millionen}} = \frac{5{,}8}{21{,}4}\,; \quad X = 16{,}2\ \text{Millionen}$$

konnte ich ihm sagen, daß er mir ungefähr eine Verdünnung 1 : 4, also etwa eine 15 Millionen-Suspension, übergeben hatte usw.

Nach der Formel $T = n \,.\, D^2 k$ wäre ich aber, auch ohne den neuen Kokkenstamm frisch gezählt zu haben, mit dem früher benutzten Aichungswert auf fast dasselbe Ergebnis gekommen. Es verhält sich nämlich

$$\frac{T}{T_1} = \frac{n \cdot D^2 \cdot k}{n_1 \cdot D_1^2 \cdot k}\,.$$

Da k bei Bakterien fast denselben Brechungsexponenten darstellt, also $k = k^1$ ist, kann die Konstante k vernachlässigt werden. Unbekannt ist in der Gleichung nur n^1, die Zahl der Bakterien von der Größe 2 μ Durchmesser. Es verhält sich also

$$\frac{5{,}8}{6{,}2} = \frac{200\ \text{Millionen} \cdot 1^2}{X \cdot 2^2}\,,$$

$$X = \frac{6{,}2 \cdot 200\ \text{Millionen}}{5{,}8 \cdot 4} = 53{,}8\ \text{Millionen}\,.$$

Der Unterschied von 6,2 Millionen statt 60 Millionen bis 53,8 Millionen), welcher auf diese Art der Rechnung fällt, ist unter anderem auch darauf zurückzuführen, daß der Durchmesser nicht ganz 2 μ gemessen hat, sondern etwas darunter (1,97 μ).

Man sieht daraus, daß es nicht unbedingt notwendig ist, für jede Bakterienart den Standard besonders zu aichen, wenn nur der Durchmesser der Bakterien bekannt ist.

Für Bacillen und vielleicht auch für Spirillen, bei denen die Länge ungefähr doppelt so groß ist wie ihr Durchmesser und die wir als Walzen oder Zylinder auffassen können, gilt die obige Formel nicht. Zur Zeit werden Messungen ausgeführt, die auch eine Gesetzmäßigkeit für diese Körper bestimmen sollen.

Praktische Winke für das nephelometrische Arbeiten mit Bakteriensuspensionen.

Die Befürchtung *v. Angerers*[1]), daß die Trübung allein kein genaues Maß für die Anzahl gebe, da bei der Herstellung der Aufschwemmung noch Agarteilchen mitgerissen werden können, fällt weg, wenn man mittels sauberer, gut abgerundeter Ösen und mit praktisch optisch völlig klarer Kochsalzlösung die Suspension herstellt und sie alsdann filtriert. Am besten untersucht man vor der Verwendung der Kochsalzlösung diese, ob sie auch in Wirklichkeit optisch leer ist. Die Aufschwemmungen dürfen nicht aufgekocht werden, da Kochen die Dispersität der Bakterienleiber verändert; dagegen ruft eine 0,5—1 proz. Carbolsäurelösung keine optische Heterogenität hervor. Die Suspensionen müssen vor Verdunstung und Verunreinigung geschützt, also fest verschlossen und steril aufbewahrt werden, sie dürfen daher auch nicht in Röhrchen aufbewahrt werden, die mit Korken oder Watte verpfropft sind, da sie so ebenfalls bei längerem Stehen eindunsten und da von den Korken oder der Watte Partikel in die Suspension gelangen und die Trübung beeinflussen können. Am besten bewahrt man die Aufschwemmungen nach ihrer Filtrierung, wodurch sie gleichzeitig aus ihrer Agglutination gerissen werden, in Fläschchen mit Glasstopfen auf. (Vorzug beim Aufschütteln nach längerem Stehen!) Daß die benutzten Röhrchen und Pipetten sauber sein müssen und keine Partikelchen tragen dürfen, ist wohl Selbstverständlichkeit. Der Apparat muß peinlich sauber gehalten werden, vor allem die Eintauchzylinder. Die Nephelometerröhrchen dürfen außen keinen Staub, keine Fädchen und keine Fingerabdrücke zeigen. Die Röhrchen sind in Äther oder Schwefelsäure-Bichromat aufzubewahren und müssen vor Gebrauch mit physiolog. NaCl-Lösung durchgespült werden. Man darf sie nicht mit Lappen putzen (Fädchen), sondern sie müssen lufttrocken werden. Man gewöhne sich, die Untersuchungsgläschen nur am oberen Ende anzufassen. Beim Hochschieben des Gläschens achte man, daß zwischen Flüssigkeit und Zylinder keine Luftblasen entstehen. Daß die Suspensionen zur Reinigung und Monodispersierung durch chemisch quantitative Filter nach Möglichkeit geschickt werden sollen, ist bereits oben ausgesprochen. Hierdurch gelingt es auch, die Staphylokokkenverbände einzeln abzutrennen. Das Suspensionsmittel, welches es auch sei, muß einen anderen Brechungsexponenten haben als die suspendierte Bakterienmasse. Sonst kann es vorkommen, daß z. B. die *Spirochaeta icterogenes* und einige Wasserspirillen wegen zu geringer Differenz ihrer Brechungsexponenten kaum eine Trübung hervorrufen. Bei unseren gewöhnlichen Vaccineuntersuchungen kommen aber auch einstweilen

[1]) Arch. f. Hyg. **93**, 24. 1923.

solche Fälle praktisch nicht vor. Es ist notwendig, zu wissen, daß das Verhältnis der Fensterhöhen beim Nephelometer[1]) *umgekehrt proportional* ist der Konzentration.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß all diese peinlich sauberen Prozeduren nicht im geringsten so umständlich sind, wie sie am Anfang erscheinen. Nach kurzer Zeit der Übung erlernt man die Handgriffe so sicher, daß man sie automatisch ausführt. Man ist dann imstande, innerhalb weniger Minuten 4—5 verschieden konzentrierte Vaccine ganz exakt zu messen. Die Fehler sind bei Respektierung der obigen Vorschriften selten höher als $\pm$ 3%. Die nephelometrische Zähl- und Meßmethode ist *keine* Methode für den Praktiker, sondern für Betriebe, die viel mit Vaccineauszählungen zu tun haben.

Zusammenfassung.

Auf Grund einmaliger gründlicher Auszählung (Zählkammer) und Größenmessung (Mikrometer) einer Bakterienart ist es möglich, mit Hilfe des Nephelometers (*Kleinmann*) nunmehr dauernd in sehr viel einfacherer Weise, Anzahl und Größe von Kokken nach der *v. Angerer*schen Bakterienformel $T = n \cdot D^2 \cdot k$ zu bestimmen. Für stäbchenförmige Bakterien gilt diese Formel nicht, sondern wahrscheinlich die vom Verf. ermittelte Formel $T = \frac{n \cdot \sqrt{\pi \cdot r^2 \cdot h}}{4}$, für deren Beweis zur Zeit noch Untersuchungen im Gange sind. Die nephelometrische oder relative Methode der Bakterienzählung ist bei peinlich sauberem Arbeiten und Sorgetragen für eine Monodispersität der Bakterien die exakteste, nicht ermüdende und von subjektiven Fehlern am wenigsten beeinflußbare optische Methode.

Die zur Untersuchung optimale Verdünnung einer Suspension bewegt sich in dem Bereich zwischen 1 Milliarde und 20 Millionen pro Kubikzentimeter.

Voraussetzung für jedes genaue Arbeiten ist die Aufgabe aller bisher angegebenen Trübungsstandarde aus Solen und anderen mehr oder weniger veränderlichen Lösungen und das Arbeiten mit dem praktisch unverwüstlichen, für jeden Apparat besonders zu aichenden Trübungsstandard, wie er oben beschrieben ist.

Man ist imstande, mit dem Apparat innerhalb kürzester Zeit 4 bis 5 verschiedene Vaccinen ziemlich exakt auszuzählen. Die Fehler sind bei Respektierung der gegebenen Vorschriften selten höher als $\pm$ 3%.

[1]) Nach *Kleinmann*, hergestellt bei Schmidt & Haensch, Berlin.

(Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern. — Direktor: Prof. *G. Sobernheim* — und aus dem Pathologischen Institut der Universität Florenz. — Direktor: Prof. Dr. *A. Lustig.*)

Über die Verbreitung des Virus des Epithelioma contagiosum der Tauben im Organismus des Kaninchens.

Von

Dr. **Marcello Lusena,**

Assistent am Institut für Allgemeine Pathologie der Kgl. Universität Florenz.

Die ursprüngliche Anschauung, daß Geflügel- und Säugetierpocken durch denselben Erreger hervorgerufen würden, war schon seit dem letzten Viertel des vorigen Jahrhunderts anscheinend endgültig verlassen worden, und erst in den letzten Jahren mehren sich die Angaben, die einen näheren Zusammenhang erkennen lassen und zeigen, daß Geflügelpocke sich in Vaccine überführen läßt (*van Heelsbergen, Tovoda, Loewenthal* und Mitarbeiter). Es ist das um so auffälliger, als diese beiden Affektionen sich sowohl klinisch als auch durch das mikroskopische Bild und immunologisch sehr weitgehend unterscheiden; die Unterschiede werden um so größer, je weiter die Analyse fortgeführt wird.

Es seien nur einige dieser Punkte hervorgehoben. Das Überstehen von Vaccine bzw. Variola führt, wenn auch nicht bei allen Tierarten in gleichem Maße, zum Auftreten von Stoffen im Serum, die im Mischungsversuch virulizid wirken; gegen Geflügelpockenvirus jedoch sind, selbst bei hochgetriebener Immunität, derartige in vitro virulizide Antikörper bisher nicht nachweisbar, obwohl ein Tier nach Überstehen der Infektion im allgemeinen unempfänglich wird. In der Verbreitung des Virus im Körper und der Leichtigkeit seines Nachweises scheint ebenfalls ein Unterschied zu bestehen, denn schon zu einer Zeit, als es noch als erwiesen angesehen wurde, daß das Vaccinevirus aus der Zirkulation rasch verschwinde und sich in der Haut lokalisiere, wurde das Geflügelpockenvirus in Blut und inneren Organen des Geflügels wiederholt und mit Sicherheit gefunden. (*Loewenthal, Burnet* u. a.). Auch mit Eintritt der Immunität verschwindet das Geflügelpockenvirus nicht, sondern bleibt in den Organen der Vögel lange Zeit, bis über 1 Jahr, nachweisbar, so daß man an „Infektionsimmunität" denken konnte (*Sanfelice, Lipschütz, Siebert*), ähnlich, wie viele Autoren die Tuberkulose und Syphilisimmunität deuten.

Da somit die beiden Vira in ihrem ursprünglichen Zustand weitgehend verschieden sind, andererseits aber Geflügelpocke durch Anpassung an das Säugetier die Eigenschaften der Vaccine annehmen kann, erschien es vom biologischen Standpunkt interessant, festzustellen, ob die ausgesprochene Tendenz des Taubenpockenvirus zur Generalisierung, wie sie im Taubenkörper erkennbar ist, von Anfang an auch im Kaninchenorganismus zutage tritt. Den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen bildete eine Beobachtung, die im Berner Institut (*Kondo*) gemacht worden war: zwei Kaninchen waren zur Gewinnung von Immunserum mit Taubenpocke (Stamm *van Heelsbergen*) cutan und 10 Tage danach subcutan geimpft worden. Das nach weiteren 10 Tagen entnommene Serum erwies sich nicht nur nicht als virulizid, sondern erzeugte bei der Verimpfung auf Tauben Geflügelpocken, enthielt also das Virus. Auf Anregung von Herrn Prof. *Soberheim* machte ich es mir nun zur Aufgabe, zu prüfen, wie lange nach Impfung mit Geflügelpocke das Virus im Körper des Kaninchens nachgewiesen werden kann.

Meine Untersuchungen habe ich mit dem Virus *van Heelsbergen* angestellt, welches kurz zuvor durch Taubenpassagen aufgefrischt worden war. Dieser Stamm, dessen sich auch *Loewenthal* für seine jüngst veröffentlichten Forschungen bediente, hat alle Kennzeichen des typischen Taubenpockenvirus: er ist sehr virulent, infiziert nach meinen Erfahrungen Tauben regelmäßig mit einer Inkubationszeit von 4—6 Tagen und verursacht ergiebige Läsionen, welche sich durch das histologische Bild und durch das Vorhandensein zahlreicher charakteristischer Einschlüsse zu erkennen geben.

Bei den Impfungen ging ich so vor, daß von dem infektiösen Schorf durch Verreiben mit physiologischer Kochsalzlösung im Mörser eine möglichst feine Emulsion hergestellt wurde. Diese Emulsion fand dann Verwendung ohne Zusatz von Glycerin oder sonstiger Antiseptica.

Eine Gruppe von Kaninchen wurde *subcutan* infiziert, eine zweite Gruppe *intratesticulär*, eine dritte Gruppe *in die Haut*.

Verschieden lange Zeit nach der Infektion wurden die Tiere getötet. Hierauf wurde eine Reihe von Organen, sowie das Blut auf das Vorhandensein des Virus untersucht. Dies geschah in der Weise, daß die mit NaCl-Lösung verriebenen Organe bzw. das Blut auf Tauben und in vielen Fällen auch auf Kaninchen verimpft wurde. Von den gleichen Organen wurden Stückchen für die histologische Untersuchung zurückbehalten.

Die *erste Reihe* umfaßte 6 Kaninchen. Jedes derselben bekam *unter* die Haut (Bauchgegend) 0,030 g Taubenschorf, in Emulsion mit 0,5 ccm NaCl-Lösung, durch Gaze filtriert. Die gleiche Emulsion wurde auf Kontrolltauben durch Scarification verimpft. Die Tiere wurden getötet nach 1, 2, 7, 13 und 29 Tagen. Ein Tier starb nach 3 Tagen. Die

örtliche Reaktion war meist beträchtlich, beruhte aber, wie sich zeigen ließ, auf bakterieller Infektion. Die Reaktion führte zur Bildung eines richtigen eiternden Krustenpanzers am Bauch und kam dann in relativ kurzer Zeit zur Heilung. Ganz geringe und vorübergehende Gewichtsabnahme.

Die histologischen Untersuchungen und die Überimpfungen auf Tauben wurden gemacht mit:

Haut	Nebenniere
Herzblut	Hoden
Leber	Milz
Niere	Hirn.

Die an dieser Gruppe von Tieren gemachten Versuche hatten ein ganz *negatives Ergebnis:* In den Organen der Kaninchen war keinerlei abnormer histologischer Befund zu erheben (abgesehen von der banalen örtlichen Reaktion), keine der Tauben, die mit verschiedenen Organen geimpft waren, zeigte eine Entwicklung von Epithelioma. Es fehlt also offenbar im Unterhautgewebe des Kaninchens jedwede Disposition dazu, das Virus aufzunehmen und seine Vermehrung zu begünstigen, oder die Ursache lag in der heftigen Entzündungsreaktion, eine Hypothese, auf die bei den folgenden Untersuchungen noch eingegangen werden soll. Jedenfalls hat die sehr ergiebige und mit sicher virulentem Material (positiver Ausfall bei den Kontrollen) gemachte Injektion keinerlei Verbreitung des Virus zur Folge gehabt.

Wir kommen zur *zweiten Versuchsreihe*, mit Einimpfung des Virus in den *Hoden.* Man kennt die Vorliebe gewisser filtrierbarer Virusarten, insbesondere der Vaccine (*Levaditi* und *Nicolau, Noguchi, Nodake*) für das Hodengewebe.

Folgendes war die Technik: Zerreibung im Mörser, Durchseihen durch Leinewand, Herstellung einer Emulsion wie derjenigen des vorhergehenden Experimentes. Jedes Tier erhielt davon 0,5 ccm in einen der Hoden.

In Abständen von 1, 6, 13 und 36 Tagen wurden die einzelnen Tiere getötet. Ein Tier ging spontan ein nach 21 Tagen, ein anderes nach 27 Tagen.

Es wurden von diesen Tieren die gleichen Gewebsentnahmen gemacht wie bei der ersten Reihe. Wiederum wurde Organbrei (NaCl-Lösung) verwendet. Auch der infizierte Testikel selbst wurde als Impfmaterial benutzt. Was die Haut betrifft, so wurde sie an Zonen entnommen, welche von der inokulierten Region entfernt lagen (Stirn, Hals usw.). Das entsprechende Material wurde auf Tauben cutan verimpft (jede Taube mit zweierlei Material, und zwar ins Augenlid und am Thorax, beiderseits), in 4 Fällen auch auf Kaninchen. Um die größere Hautoberfläche des Kaninchens auszunutzen, wurde eine größere Zahl von Impfungen an ihnen ausgeführt. Die Haut wurde rasiert und durch Scarification beimpft in 9 Zonen von kleiner Oberfläche (ca. 3 × 3 cm), die man am Rücken, an den Flanken, auf der Stirn gewählt hatte, und welche durch breite Flächen getrennt waren, an welchen man die Haare stehengelassen hatte.

Ohne den weiteren Beobachtungen an einzelnen Tieren vorzugreifen, will ich gleich bemerken, daß abgesehen von zwei spontanen Todes-

fällen die Tiere außer der örtlichen Läsion weder Übelbefinden noch erhebliche Gewichtsabnahmen, noch irgendwelche Alteration allgemeinen Charakters gezeigt haben. Nur der geimpfte Testikel zeigte Entzündungserscheinungen mit beträchtlicher Volumenvermehrung, Zunahme der Konsistenz, chronischen Verlauf, Erscheinungen, die bei dem letzten Tier (36 Tage nach der Impfung) noch nicht verschwunden waren.

Die Verimpfung der Organe auf Tauben ergab vielfach ein positives Resultat. Um die Spezifität dieser Läsionen zu beurteilen, genügte fast immer der klinische Weg: gewöhnlich waren die Erscheinungen sehr charakteristisch. In ganz wenigen Fällen, in denen die klinischen Erscheinungen nur sehr leicht waren, wurde jeder Zweifel dadurch behoben, daß man die spezifische Natur durch nachfolgende Taubenpassage bestätigte.

Kaninchen 1. 1420 g, geimpft am 12. IX. 1924 am rechten Hoden. Getötet nach 24 Stunden (1360 g).

Obduktion: Der geimpfte Hoden leicht gerötet. Er ist klein (wird für Impfungen verwendet).

Nichts an den übrigen Organen.

Von den Überimpfungen auf Tauben haben positives Ergebnis nur diejenigen von:

geimpftem Hoden (Inkubation 6 Tage),

Haut (Inkubation 12 Tage; schwacher Erfolg).

Kaninchen 2. 1300 g, geimpft den 12. XI. 1924 am rechten Hoden. Getötet nach 6 Tagen. Keine Gewichtsabnahme.

Obduktion und Entnahme: wie oben. Leichte Entzündung des geimpften Hodens.

Impfungen: positives Ergebnis nur für *Leber.*

Kaninchen 3. 1440 g, geimpft den 10. IX. 1924 am rechten Hoden. Getötet nach 13 Tagen. Gewichtsabnahme von 140 g. Geimpfter Hoden vergrößert (auf das Doppelte) und verhärtet; histologische Untersuchung: Nekrose des Testikelparenchyms, ohne daß die histologische Zeichnung des Organs verschwände. Zahlreiche Bacillen.

Impfungen werden gemacht auf Tauben und auf Kaninchen B. Von den ersteren fallen stark positiv aus nur die von der *Haut* und von dem *geimpften Hoden.* Bei Kaninchen B treten nach 5—6 Tagen in jeder beimpften Zone ziemlich reichliche kleine Borken auf, von banalem Aussehen, ohne Anzeichen dafür, daß es sich um spezifische Veränderungen des Epithelioma oder der Vaccine handeln könne. Mehr ausgeprägt sind nur die von den Nebennieren. Von diesen Krusten werden 2 (von Leber und von Nebennieren) auf Tauben verimpft, mit negativem Ergebnis, und auf das Kaninchen E. Über das letztere, welches gleichzeitig auch für anderes Material diente und *positiv* reagierte, werde ich weiterhin zu berichten haben.

Kaninchen 4. 1500 g, geimpft am 10. XI. 1924. Geht spontan ein nach 21 Tagen. 500 g Gewichtsabnahme.

Obduktion: Hoden stark vergrößert. Auf dem Schnitt ein Bild ähnlich dem von den vorhergehenden Fällen. Nichts an den verschiedenen Organen. Nur die Leber zeigt etliche graue harte Knötchen von der Größe etwa eines Hirsekornes. Mikroskopisch bestehen diese Knötchen aus Bindegewebe, das um einige Gallenkanälchen herum in Wucherung geraten war. Also eine Angiocholitis proliferativa,

wahrscheinlich infektiöser Natur. Sie mußte zur Todesursache in Beziehung stehen. Einige mit Organen besäte Bouillonproben bleiben steril.

Dieses Tier hatte (vielleicht wegen seiner durch den anderen Krankheitsprozeß geminderten Widerstandsfähigkeit) die Entfaltung des Epitheliomavirus bestens begünstigt. *Seine Organe erweisen sich alle als infektiös.* Sie rufen bei *Tauben* ergiebige Läsionen hervor, einige Organe (Nieren, Nebennieren, Hoden) mit nur 4 tägiger Inkubationszeit, und bei einem Kaninchen (C) Schorfe analog den schon erwähnten; 2 dieser Kaninchenschorfe (von Niere und von Hirn) wurden erfolglos auf Tauben verimpft, dagegen mit *positivem* Ergebnis auf das bereits erwähnte Kaninchen E.

Kaninchen 5. 1120 g schwer, geimpft am 10. IX. Geht spontan nach 27 Tagen ein (kein Gewichtsverlust).

Obduktion: Nekrose des Hodens. Leichte Coccidiosis. Retrosternaler Absceß etwa bohnengroß von weißlichem, käsigem Eiter.

Von den Impfungen auf Tauben fällt nur die von der *Niere* positiv aus. Bei einem Kaninchen (D) verursacht die Impfung in 4—5 Tagen die üblichen Borken. Eine davon (aus dem Hirn) wird mit stark positivem Ergebnis auf eine Taube verimpft.

Kaninchen 6. 1450 g, am 10. IX. geimpft. Tötung nach 36 Tagen (Abnahme um 100 g).

Obduktion: Der übliche Befund in dem geimpften Hoden. Nichts in den anderen Organen.

Die *Tauben*impfungen fallen *positiv* aus für alle Organe, außer Leber und Hoden.

Das geimpfte *Kaninchen* geht nach etlichen Stunden interkurrent ein.

Was nun das mehrfach erwähnte Kaninchen E betrifft, so wurde dies mit Material verschiedenen Ursprungs infiziert, und zwar mit Krusten von Kaninchen B und C, also mit Material, das auf Organe von Kaninchen der 2. Serie (intratestikulär) zurückging. Bemerkenswert war, daß dieses Kaninchen, wie erwähnt, auf die Impfungen positiv reagierte, während das gleiche Ausgangsmaterial bei Tauben keinerlei spezifische Läsion hervorrief. Die bei Kaninchen E entstandenen Krusten *konnten nun aber wieder auf Tauben mit Erfolg weiterverimpft* werden. Ich wüßte hierfür keine andere Erklärung zu geben, als daß im Kaninchenorganismus eine Virulenzsteigerung stattgefunden hat.

Die *histologische* Untersuchung der Organe fiel auch bei den Tieren der Gruppe II durchweg negativ aus, insofern, als sich kein irgendwie ungewöhnlicher Befund erheben ließ.

Aus den im Vorstehenden dargelegten Versuchen können wir entnehmen: Während die Organe der subcutan infizierten Kaninchen in keinem Falle Tauben zu infizieren vermochten, wurden die Organe aller auf testiculärem Wege geimpften Tiere mehr oder minder infektiös. Und zwar hat Kaninchen 4 in allen untersuchten Organen das Virus enthalten. Von den übrigen 5 gelang

3 mal Infektion mit Haut
3 mal Infektion mit dem geimpften Hoden
1 mal Infektion mit Leber
1 mal Infektion mit Niere
1 mal Infektion mit Hirn
1 mal Infektion mit Milz
0 mal vom nicht geimpften Hoden
1 mal mit Blut
1 mal mit Nebennieren.

Diese Angaben beziehen sich auf das Ergebnis der Verimpfung auf Tauben. Wenn man auch die an Kaninchen vorgenommenen Impfungen mit in Rechnung ziehen will, soweit die Übertragung der Borken auf Tauben gelang, so erhöht sich die Zahl der positiven Befunde. Und zwar:

1. Bei Kaninchen 3. Dieses hatte Tauben direkt nur mit seiner Haut und mit dem geimpften Testikel infiziert, hingegen bei einem Kaninchen mit *jedem* Organ, besonders mit den Nebennieren, kleine Krusten hervorgerufen, welche bei Übertragung auf Tauben positiven Ausfall ergaben.

2. Bei Kaninchen 5, welches Tauben nur mit Niere infiziert hatte, wogegen bei Kaninchen jedes Organ dünne kleine Borken erzeugte. Eine beliebig ausgewählte Borke (Hirn) erwies sich für Tauben als virulent[1]).

Die an den vorgenannten Tieren durch Kaninchenimpfung erhaltenen Resultate darf man gleichwohl nur mit Vorbehalt annehmen. Allenfalls könnte man noch den Nachweis des Virus in den Nebennieren von Kaninchen 3 als erbracht ansehen, denn wenn auch dadurch keine Tauben infiziert wurden, so haben sich doch bei den Kaninchen beträchtlich dickere Krusten entwickelt, als bei Verimpfung anderer Organe. Weshalb die mit den letzteren erzielten Reaktionen nicht als völlig beweiskräftig zu betrachten sind, wird später begründet werden.

Die oben wiedergegebene kleine Statistik zeigt deutlich, daß die *Impfstelle* (Hoden) und die *Haut* in erster Linie das Virus enthalten. An der Impfstelle wird offenbar wenigstens ein Teil des eingeführten Virus festgehalten, wobei unter anderem vielleicht die Wirkung des Bindegewebsmantels, der von der Entzündungsreaktion herrührt, eine Rolle spielt. Die Bedeutung der Haut bleibt hingegen beachtenswert. Um so mehr, weil man dabei noch bedenken muß, daß die Aufschließung des Hautgewebes auch bei größter Sorgfalt durch Zerschneiden und Zerreiben nicht in demselben Maße gelingt, wie bei anderen Organen. Dementsprechend ist auch das Virus weniger ausgiebig zu befreien und nutzbar zu machen. Es würde sich hieraus also ergeben, daß unser Virus eine gewisse dermatotrope Eigenschaft besitzt. Dies stimmt mit den Ergebnissen einiger Untersuchungen, welche weiter unter erörtert werden sollen, gut überein. Was die übrigen Organe betrifft, so scheint nach unseren Resultaten keines besonders bevorzugt zu werden. Die von *Levaditi* und *Nicolau* für das Vaccinevirus und ebenso für das

[1]) Die Tauben, welche nach direkter Impfung mit Material von Kaninchen 5 von Erkrankung verschont geblieben waren, wurden später, zusammen mit anderen der 2. wie der 1. Versuchsgruppe, mit Taubenpockenvirus wiedergeimpft, um zu sehen, ob etwa der Kontakt mit spärlichem oder schwachem Virus eine Immunität verursacht habe. Aber alle sind regelrecht erkrankt.

Virus der Geflügelpocken angenommene Ektodermophilie trat nicht überzeugend zutage.

Aus den Versuchsergebnissen dürfen wir entnehmen, daß das Epitheliomavirus im Kaninchenorganismus aktiv wuchert. Dies wird schon bei der Untersuchung der infizierten Tiere nach 24 Stunden deutlich und ist auch noch nach 36 Tagen, ohne irgendwelche Minderung, zu erkennen. Ja, die Organe der letzten Kaninchen haben sich als hochvirulent erwiesen, und zwar ohne daß allgemeine klinische oder auch histopathologische Erscheinungen zu beobachten wären, analog dem, was bei Tauben geschieht. Das Virus verhält sich bei weiteren Kaninchenpassagen anscheinend ebenso. Durch Hautimpfungen sowohl mit Krusten wie mit Organen wurden, ausgehend von irgendeinem der am Hoden geimpften Kaninchen, bei der gleichen Tierart einige Passagen durchgeführt, in einem Falle bis zur vierten Generation. Die Läsionen waren fast stets gering und bestanden in kleinen Krusten, nicht unähnlich denen, welche man auch durch bloße Scarificationen hervorrufen kann. Nur waren sie in gewisser Weise etwas saftreicher, was ich den Emulsionen zuschreiben möchte, die zur Verwendung kamen. Diese bringen, wenn es sich um Krustenmaterial handelt, in die geschorene, irritierte und scarifizierte Haut zugleich viele Fäulniskeime. Einige Läsionen, die sich bei Tauben nach verschiedenen Kaninchenpassagen durch das Virus hervorrufen ließen, wurden mikroskopisch untersucht; sie zeigten das typische histologische Bild. Somit bewahrt das Virus auch nach Kaninchenpassage seine Eigenschaften gegenüber dem gewöhnlichen Wirt.

Es bleibt nun noch die *dritte Beobachtungsgruppe* zu besprechen, welche die auf dem Hautwege geimpften Tiere betrifft.

Mit dem ersten dieser Tiere kamen meine in Bern gemachten Versuche zum Abschluß. Danach kehrte ich in meine Heimat zurück und der Gegenstand wurde im Institut für Allgemeine Pathologie in Florenz erledigt.

Kaninchen 1 der dritten Reihe wurde mit der gleichen Technik infiziert, die für die Einimpfung des Vaccinevirus angewendet wird. Als Material wird nicht das ursprüngliche Taubenvirus benutzt, sondern ein Virus, das fünf Kaninchenpassagen durchlaufen hatte. Das Tier hatte ich von den Versuchen *Loewenthal-Kondo* übernommen. Es wurde sechs Tage nach der Impfung getötet, als die Hauteruption in vollem Gang war.

Alle von diesem Kaninchen entnommenen Materialien haben bei Tauben ziemlich ergiebige Erscheinungen hervorgerufen, ja die ergiebigsten, die ich überhaupt zu beobachten Gelegenheit hatte, soweit es sich um Organe und nicht um Krusten handelte. Bei *Kaninchen* wurden ziemlich dicke Schorfe hervorgerufen, besonders bei Herkunft der Proben

von Haut, Niere, Milz und Hirn. Wenn diese Schorfe abfielen (und einige davon hatten sich schon innerhalb von 5 Tagen trocken abgeblättert) erschien die bloße Haut nicht in normalem Zustand, wie gewöhnlich, sondern hier und da erhaben infolge deutlicher Papelerhebungen, die dann aber bald verschwanden.

Das bestätigt, daß das Epitheliomavirus sich durch wiederholte Kaninchenpassagen keineswegs abschwächt, weder für die Tauben, noch für die Kaninchen, vielmehr sogar eine Virulenzsteigerung für beide Tierarten erwirbt.

Bei den in der Folge in Behandlung genommenen Tieren dieser Gruppe habe ich auf die weitere Untersuchung verschiedener Organe verzichtet, denn die bisherigen Befunde hatten nach meiner Meinung schon die Verbreitung auf dem Blutwege erwiesen. Das Verhalten des Virus im Körper des Kaninchens würde also mit dem beim Geflügel übereinstimmen. Ich habe aber zu erfahren gesucht, ob das Virus sich lange im Blut erhalte. Blutproben, die von einer Gruppe von vier mit originärem Taubenvirus cutan geimpften Tieren in verschiedenen Zeitabständen (5—15 Tage) entnommen wurden, haben *immer ein positives Resultat gezeigt* (Verimpfung auf Tauben).

In einem Falle bot sich mir Gelegenheit, die Anwesenheit des Virus im Kaninchenkörper noch nach längerer Zeit festzustellen. Es handelte sich um ein Tier, das am 6. Januar 1925 am Rücken geimpft worden war und in wenigen Tagen seine Borken abgestoßen hatte (Nr. 10). Dann ging es spontan nach 65 Tagen ein. Impfungen wurden am 11. März 1925 mit Haut (Bauchgegend) und Hornhaut an einer Taube vorgenommen. *Ergebnis:* Beide Proben verursachen zahlreiche Eruptionen, die schon am dritten Tage deutlich werden, dick sind und an den folgenden Tagen verschmelzen. *Das Virus war also nach 65 Tagen in bemerkenswerter Quantität in der Haut und in der Hornhaut vorhanden, ein Befund, der um so bezeichnender ist, als die Menge des verwendeten Materiales nur gering gewesen war.* Ein weiteres Beispiel ähnlicher Art erwähne ich später noch.

Ein weiteres Tier schließt die Reihe dieser Versuche. Es wird ein trächtiges Weibchen am 8. März 1925 am Ende der Tragzeit geimpft. Nach 36 Stunden wirft es 7 Junge, die keinerlei pathologische Anzeichen bieten.

Zur Verimpfung auf Tauben gelangen sofort:

A. Blut der Mutter, aus einer Seitenvene des Ohres. Ergebnis: Viele, kleinbleibende und nicht konfluierende Knötchen. Inkubationszeit 3 Tage.

B. Leber eines der Jungen. Ergebnis: Nur ein Knötchen. Inkubationszeit 8—9 Tage.

C. Haut desselben Jungen. Resultat: Stark positiv; dicke Geflügelpocken, welche auf der ganzen Fläche verschmelzen. Inkubationszeit 4 Tage.

Das Virus ist, wie sich hieraus ergibt, bereits 36 Stunden nach cutaner Impfung im Blut der Mutter vorhanden gewesen *und auf den Organismus des Fetus übergegangen. In der Leber des jungen Tieres ist das Virus nur spärlich vorhanden, in der Haut desselben in solcher Quantität, daß bei Tauben sehr reichliche Eruption dadurch hervorgerufen wird.*

Ich war noch nicht in der Lage, hinsichtlich dieser Übertragung von der Mutter auf den Fetus weitergehende Einzelheiten zu studieren, was die Chronologie, die Immunität usw. betrifft. Es zeigt sich jedenfalls auch hierin die Tendenz zur Generalisierung bei dem Virus der Geflügelpocken in viel ausgesprochenerem Grade als bei dem Vaccinevirus.

Ferner zeigt diese ganze dritte Versuchsreihe einen auffälligen Unterschied gegen die beiden vorangehenden. Während nämlich nach subcutaner und intratesticulärer Infektion der Virusnachweis im Blut nur vereinzelt gelungen war, ist er hier, soweit untersucht, regelmäßig und zu den verschiedensten Zeiten erbracht worden. Bei Kaninchen 1 konnte man an eine durch Passage erworbene Eigenschaft des Virus denken, indessen weisen die übrigen, mit ursprünglichem Taubenvirus geimpften Tiere darauf hin, daß es wohl der cutane Impfmodus ist, der hierfür maßgebend sein dürfte.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Ausbreitung des Virus in der *Haut* nach cutaner Impfung.

Ich erwähnte schon, daß in einigen Fällen zum Virusnachweis verschiedene Organe gleichzeitig auf die scarifizierte Haut des gleichen Kaninchens aufgebracht wurden und, da die Krusten sich meist nicht deutlich als spezifische Läsionen erkennen ließen, die endgültige Klärung erst durch Verimpfung auf Tauben erbracht werden konnte. Auch habe ich schon betont, daß die große Zahl positiver Befunde, wie sie durch die Verimpfung der Organe auf Kaninchen erhoben werden konnte, mit einer gewissen Reserve betrachtet werden muß. Man könnte daran denken, daß hier ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei dem *Calmette-Guérin*schen Versuch. Wenngleich dieser sich auf intravenöse Injektion bezieht, so konnte angesichts der größeren Neigung zur Generalisierung des Taubenpockenvirus auch bei cutaner Insertion möglicherweise das gleiche Phänomen sich zeigen.

Infolgedessen habe ich einige Versuche angestellt, bei denen ich das ursprüngliche Virus auf Kaninchen in einer bestimmten Zone verimpfte und zugleich eine andere davon entfernt liegende Hautstelle steril scarifizierte. Die Stellen waren so gewählt, daß ein äußerer Transport von Keimen ausgeschlossen war. Auch hielt ich die Tiere isoliert. Die Krusten an den Kontrollstellen waren in diesen Fällen im allgemeinen dünner als die Viruskrusten, immerhin lassen sie sich mit einer Pinzette abheben, ohne die Haut darunter zu verletzen. Diese Kontrollkrusten wurden mit Kochsalzlösung verrieben und mit der üblichen Technik auf Tauben verimpft.

Der Versuch wurde von mir an 4 Kaninchen gemacht. Im Abstand von 1—5 Tagen, nach der Impfung wurden die Krusten entnommen, wobei sich mit Ausnahme eines einzigen Falles die Bestätigung meiner Vermutung erfüllte. *Die Krusten, welche sich auf den Kontrollzonen gebildet haben, sind infizierend.* Nur bei einem der drei Tiere haben die Krusten der Kontrollstellen die Läsionen nach einer etwas längeren Inkubationszeit hervorgerufen als die Viruskrusten. Was den einen negativen Fall angeht, so muß man sich gegenwärtig halten, daß die Kontrollkrusten sehr dünn waren und daher ein sehr spärliches Material ergaben.

Bemerkenswert ist eines der Tiere, bei dem die Entnahmen nach 1 Tag und nach 3 Tagen gemacht worden waren und das gleiche positive Resultat ergeben hatten. Dieses Tier war an der Interscapularregion geimpft, die sterilen Scarificationen am Steiß und auf der Stirn angebracht worden, wo sich dann recht dicke und virusreiche Krusten gezeigt haben. Nach Beendigung der Versuche beließ man das Tier in seinem Käfig, wo es spontan 46 Tage nach der Impfung einging. Die Krusten waren seit 5—6 Wochen ganz verschwunden, das Haar wieder nachgewachsen. Ich habe dann die Stirn erneut geschoren und keine Spur[1]) der früheren Läsion gefunden. Von der Haut wurde nun Material entnommen und auf Tauben verimpft. Ebenso wurde Material vom Hirn verimpft. Das letztere ergab nur ein einziges kleines Knötchen, die Haut hingegen verursachte sehr intensive Erscheinungen, die schon am Morgen des dritten Tages hervortraten. Das war mit die kürzeste überhaupt beobachtete Inkubationszeit. *Das Virus ist mithin wie in dem früher erwähnten Falle noch nach längerer Zeit (46 Tage) nachweisbar gewesen, und zwar in beträchtlicher Menge und Wirkungskraft im Hauptgebiet, das nun schon seit lange gesund war und vordem Sitz der durch Kontrollscarification veranlaßten Krusten gewesen war.* Die lange Persistenz des Virus an der durch sterile Scarification gereizten Stelle ist freilich nicht auf diese Läsion zurückzuführen, sondern hängt offenbar mit der Generalisierung des Virus in dem ganzen Hautorgan zusammen, wie sich aus dem Vergleich mit dem früher besprochenen Befund bei Kaninchen 10 ergibt.

Hinsichtlich der Deutung dieser Befunde scheint es mir, daß eine solche leicht aus den Vorstellungen abgeleitet werden kann, welche Allgemeingut geworden sind: Das den *Kaninchen* in die Hoden oder cutan eingeimpfte Epitheliomavirus vermehrt sich dortselbst und breitet sich allerwärts aus, namentlich in der Haut. Es ist auch recht wahrscheinlich, daß die *gereizte* Haut ihm einen besonders günstigen Boden bietet. Vergleichsweise darf bemerkt werden, daß man bei der *Taube*, dem für

[1]) Bei Kaninchen wie auch bei Tauben bleiben selbst nach markanten Läsionen niemals Narben.

dieses Virus hochempfänglichen Tier, bei dem schon eine geringe Virusmenge genügt, um spezifische Reaktion auszulösen, die Generalisierung des Virus in der Haut, nach cutaner Infektion, meist *nichts* nachzuweisen vermag. Wenn man auf der einen Körperseite Brusthaut und Augenlider stark impft, so pflegt es auf der anderen Körperseite trotz ausgiebiger Scarification nicht zur Entwicklung von Pocken zu kommen. Ich habe dies wenigstens bei einer nachgerade beträchtlichen Zahl von Impfungen festgestellt. Auf endovenöse Einführung hingegen soll eine Lokalisation auf den (durch Federnrupfen usw.) gereizten Hautstellen erfolgen (*Burnet*).

Doch völlig werden diese Fragen nur durch weitere Untersuchungen über die Geschwindigkeit und die Art der Verbreitung des Virus in der Taube und im Kaninchen geklärt werden können.

Als praktische Lehre ergibt sich jedenfalls: Wenn es sich darum handelt, das Virus der Taubenpocke im Kaninchenversuch nachzuweisen, darf für verschiedene Proben nicht ein und dasselbe Individuum benutzt werden.

Zusammenfassung.

Unsere Untersuchungen, bei denen wir das Taubenpockenvirus (Stamm *van Heelsbergen*) *auf Kaninchen subcutan, intratesticulär und cutan verimpften* und die Verbreitung und Persistenz des Virus im Kaninchenorganismus prüften, und zwar durch Verimpfung der Organproben auf Tauben und Kaninchen, haben zu Ergebnissen geführt, die sich in folgende *Schlußsätze* zusammenfassen lassen:

1. Das mit Taubenpockenvirus infizierte Kaninchen zeigt *niemals klinische Allgemeinsymptome* irgendwelcher Art noch auch histologisch erkennbare Organveränderungen.

2. Die nach cutaner Infektion eintretende *lokale* Reaktion (Borkenbildung) verläuft immer *leicht und rasch.*

3. Das Virus, das sich bei dem *Geflügel generalisiert und lange im Körper hält,* läßt das *gleiche Verhalten* auch beim *Kaninchen* erkennen. Positiver Befund von 24 Stunden bis zu 65 Tagen.

4. Das Virus ist im *Blut* und in *allen Organen und Geweben* zu finden, ohne embryogenetisch zu begründende Bevorzugungen. Nur zur Haut besteht eine erhöhte Affinität. (Über Hornhaut nur eine Beobachtung.)

5. Die Generalisierung erfolgt deutlich nach *cutaner* und *intratesticulärer* Infektion. Subcutane Impfungen lieferten in den mitgeteilten Versuchen in dieser Hinsicht ein negatives Ergebnis.

6. Das Virus *vermehrt sich offenbar aktiv* im Kaninchenkörper.

7. Das Virus wird *durch wiederholte Kaninchenpassagen in seiner Virulenz nicht beeinträchtigt.* Sie erschien vielmehr *in gewissen Fällen verstärkt.* Das Passagevirus rief bei Tauben Veränderungen von gleichem histologischen Charakter hervor wie das ursprüngliche Virus.

8. Werden bei einem *cutan infizierten* Kaninchen gleichzeitig an entfernter Hautstelle *sterile Scarificationen* angelegt, so erweisen sich die *hier gebildeten Krusten bei der weiteren Verimpfung als genau so infektiös wie die der Infektionsstelle.* Die borkenartigen Läsionen an den infizierten Hautstellen sind meist nicht stärker als die an den Kontrollscarificationen.

9. Es gelingt also bei dem Taubenpockenvirus auch nach cutaner Infektion nach Art des *Calmette-Guérin*schen Versuchs mit Vaccine an gereizter Hautstelle das Virus zur Ansiedlung zu bringen. Indessen ist das *Virus auch an intakten Hautstellen nachweisbar; es verbreitet sich in dem gesamten Hautorgan.*

10. Ein *am Ende der Tragzeit cutan infiziertes weibliches Kaninchen* wirft *klinisch gesunde Junge*, die sich bei der Untersuchung aber *als infiziert erweisen.* Auch das Blut der Mutter ist virushaltig. —

Der Ausdruck meines aufrichtigen Dankes gilt Herrn Prof. *Sobernheim*, der mich in seinem Institut gastlich aufgenommen hat und mir das erforderliche Material zur Verfügung stellte, sowie Herrn Privatdozenten Dr. *Loewenthal*, der mir gleichzeitig mit ihm teilnehmendes und beratendes Interesse hat angedeihen lassen.

Literaturverzeichnis.

Burnet, Ann. de l'inst. Pasteur 1906, S. 742. — *Calmette* et *Guérin*, Ann. de l'inst. Pasteur 1901. — *van Heelsbergen*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **84**. 1920. — *van Heelsbergen*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **89**. 1923. — *Levaditi* et *Nicolau*, Ann. de l'inst. Pasteur **37**, Nr. 1. 1923. — *Lipschütz*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, Ref. 1909, S. 101. 3. Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie. — *Lipschütz*, Handbuch der pathogenen Protozoen (v. Prowazek). Bd. I. S. 230. — *Lipschütz*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle und Wassermann) 1913. — *Lipschütz*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. 1922. — *Loewenthal*, Dtsch. med. Wochenschr. 1906, S. 678. — *Loewenthal*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 6. — *Loewenthal, Kadowaki* und *Kondo*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **94**, H. 3/4. — *Nodake*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **41**, H. 1. 1924. — *Noguchi*, Journ. of exp. med. **21**. 1915. — *Sanfelice*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1914, S. 257. — *Siebert*, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt **37**, 588. 1911. — *Toyoda*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **102**, 92. 1924.

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch". Abteilung für Chemotherapie. — Geh. Rat Prof. *F. K. Kleine.*)

Weiterer Beitrag zur Immunbiologie der Trypanosomen.

Zur Kritik des Kreuzinokulationsverfahrens als immunbiologische Methode der Artabgrenzung.

Von

Dr. H. Kroó,

Assistent am Institut.

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich einleitend die Schwierigkeiten der Artabgrenzung der pathogenen Trypanosomen ausführlicher besprochen. Insbesondere wurden zwei Methoden ihrer Identifizierung hervorgehoben. Die von *Laveran* und *Mesnil* inaugurierte Methode der Kreuzimmunisierung und der von *Kleine* eingeschlagene Weg, nach dem die Trypanosomen von dem natürlich infizierten Tier direkt, möglichst ohne Zwischenpassage, auf eine größere Anzahl verschiedener Tierarten verimpft werden. Neben der Morphologie ist hierbei die natürliche, unveränderte spezifische Pathogenität für die Diagnosenstellung ausschlaggebend. Im Verlaufe der obenerwähnten Arbeit konnte ich dann zeigen, daß 3 Laboratoriumsstämme von Tryp. brucei verschiedener Herkunft (Stamm „Prowazek" Berlin, Stamm „Ferox" Frankfurt, und Stamm des „Institut Pasteur" Paris), also Parasiten der *gleichen Art,* im immunbiologischen Versuch ausgewertet, sich different verhielten, *als wären sie 3 verschiedene Arten.*

Hiernach lag es nahe zu prüfen, ob durch den Aufenthalt in verschiedenen Tiergattungen nicht auch die Parasiten *ein und desselben Trypanosomenstammes* sich so verändern, daß sie bei der immunbiologischen Prüfung als verschiedene *Trypanosomenarten* angesprochen werden mußten. Das Ergebnis mochte für die Bewertung der Kreuzimmunisierungsmethode entscheidend werden.

Bevor ich meine Versuchsresultate mitteile, möchte ich des besseren Verständnisses wegen die *Laveran-Mesnil*sche Methode kurz beschreiben.

Eine Ziege oder Schaf (die Verfasser benutzten meist Ziegen oder Schafe zu diesen Versuchen, weil die meisten Trypanosomeninfektionen bei diesen Tieren relativ häufig ohne jeden therapeutischen Eingriff in Heilung übergehen) wird mit einem bekannten Laboratoriumsstamm von Trypanosomen geimpft. Nachdem die Infektion abgelaufen, stellt

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, H. 1, S. 247. 1925.

man die völlige Heilung fest durch Verimpfung größerer Blutmengen auf hoch empfindliche Tiere (z. B. Maus, Ratte, Hund). Dann wird die Immunität der Tiere gegen den ursprünglichen Trypanosomenstamm geprüft, schließlich impft man mit jenem Trypanosoma nach, dessen Art festgestellt werden soll. Erfolgt keine Infektion, so werden die beiden Stämme als identisch betrachtet, erkrankt aber das Tier, so gilt die Artverschiedenheit als erwiesen. Zugleich wird der Versuch in umgekehrter Richtung ausgeführt, indem man zuerst gegen den zweiten Stamm immunisiert und dann mit dem ersten Stamm nachimpft. Die Ergebnisse beider Versuche müssen übereinstimmen, denn sonst kann schon eine Virulenzsteigerung resp. -abschwächung desselben Trypanosomas eine Verschiedenheit vortäuschen. Auf Grund dieses Verfahrens wurden eine ganze Reihe von Trypanosomen als besondere Arten abgegrenzt, u. a. Tryp. pecaudi, cazalboui, dimorphon, congolense, togolense.

Wegen seiner Wichtigkeit sei hier ein Schulbeispiel von *Laveran* selbst angeführt[1]).

Un mouton inoculé le 8 mars 1906 à Ségou sur une ânesse infectée de trypanosomiase à Garo, en novembre 1904, est ramené en France par M. Cazalbou et m'est remis le 3 mai 1906. L'examen histologique du sang du mouton fait a diverses reprises dans le cours des mois de mai, juin et juillet, est negatif.

Le 6 mai, j'inocule 2 cobayes et 2 souris; les cobayes reçoivent chacun 3 c. c. de sang. Les cobayes et les souris s'infectent. Les cobayes meurent en 22—34 jours, les souris en 18 et 20 jours.

Le 16 juillet, on inocule sur le mouton 2 cobayes et 2 souris qui ne s'infectent pas (les animaux ont été suivis jusqu' au 3 septembre).

Le 3 août, un chien reçoit dans le péritoine 30 c. c. du sang du mouton; ce chien, qui a été suivi jusqu'au 28 novembre, ne s'est pas infecté.

Le 8 septembre, le mouton est réinoculé avec son virus qui a été conservé sur cobayes. Le cobaye qui sert à l'inoculation a des trypanosomes très nombreux ayant tous les caractères des trypanosomes trouvés sur le mouton à l'arrivée en France.

Le 24 septembre, un chien reçoit dans le péritoine, 20 c. c. du sang du mouton; ce chien ne s'est pas infecté à la date du 3 novembre. Le mouton a donc l'immunité pour le *Tr. Pecaudi.*

Le 3 novembre, j'inocule le mouton à l'oreille avec le *Tr. dimorphon.* La souris, dont le sang est inoculé au mouton, est fortement infectée; j'inocule sous la peau d'une des oreilles du mouton quelques gouttes du sang de la souris mélangées à de l'eau physiologique citratée.

L'examen histologique du sang du mouton fait le 18 novembre est négatif.

20 novembre. On inocule 3 souris sur le mouton. Les 3 souris sont infectées le 25 novembre, elles meurent en 7, 8 et 10 jours.

Le 15 janvier 1907, le mouton pèse 30 kilos; il a donc augmenté de poids malgré l'infection par *Tr. dimorphon.*

Une souris inoculée le 20 janvier sur le mouton s'infecte et meurt le 31 janvier.

---

[1]) *Laveran*, Sur les Trypanosomiases du Haut-Niger. Ann. de l'inst. Pasteur **21**, 344. 1907.

Il ressort de cette observation qu'un animal ayant l'immunité pour *Tr. Pecaudi* peut s'infecter de *Tr. dimorphon,* d'où l'on doit conclure que ces tryanosomes appartiennent à deux espèces distinctes.

Wie ersichtlich, schließt *Laveran* aus diesem Versuch, daß Tryp. pecaudi und dimorphon verschiedene Arten seien. Bemerkt sei, daß in diesem Beispiele das Tryp. dimorphon von *Dutton* und *Todd* im Jahre 1903 in Senegambien vom *Pferde* abgeimpft, 3 Jahre lang in Paris in *verschiedenen Tieren* fortgezüchtet und schließlich am *Schaf* auf seine Artzugehörigkeit untersucht wurde.

Ich komme nun zu den von mir ausgeführten Versuchen. Am 5. X. 1925 wurden von einer Maus 1 Rind, 2 Schafe, 1 Hund, 1 Kaninchen und 1 Meerschweinchen mit einem immunbiologisch einheitlichen Laboratoriumsstamm von Tryp. brucei „Prowazek" subcutan geimpft. Nach 4 Wochen, am 2. XI., impfte ich von jedem Tier Blut auf Mäuse zurück und prüfte die gewonnenen Stämme immunbiologisch gegeneinander.

Zur Technik und Methodik: Die Vorinfektionen wurden an den Mäusen intraperitoneal, die Nachinfektion intravenös vorgenommen, das letztere, um die Trypanosomen der Wirkung der Immunkräfte möglichst schnell und intensiv auszusetzen. Da mit den verwendbaren Antimondosen eine Befreiung des peripheren Blutes von Trypanosomen nicht immer zu erreichen ist, habe ich abweichend von meiner eingangs erwähnten Arbeit die Abheilung diesmal auch mit Arsacetin vorgenommen. Durch eine zweimalige subcutane Verabreichung von 0,5 ccm einer Lösung 1 : 100 an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bei starker Infektion (Gewicht der Mäuse 15—22 g) konnte stets eine Sterilisierung des Blutes erreicht werden. Als Kontrollen liefen mit: 1. Infektionskontrollen zur Feststellung der erfolgten Infektion, 2. Rezidivkontrollen, um das Auftreten des Rezidivs des vorgeimpften Stammes, d. h. die Dauer der erreichten Immunität zu konstatieren, und 3. Arzneikontrollen, nämlich Kontrollen, die zeigen sollten, wie lange das einverleibte Arsacetin das Angehen einer Infektion verhindert. Zweimalige Verabreichung von 0,5 ccm Arsacetin 1 : 100 wirkt nach 48 Stunden nicht mehr prophylaktisch.

Im Vergleich untereinander wie mit dem Mäusestamm erwiesen sich *sämtliche Stämme im gekreuzten Immunitätsversuch verschieden.* So konnten Mäuse, die dem Stamm „Rind" gegenüber sich als immun erwiesen, mit dem Stamm „Schaf", „Hund", „Kaninchen", „Meerschweinchen", „Maus" wiederinfiziert werden. Der Versuch wurde in jeder möglichen Variation durchgeführt, immer mit demselben Resultat. Die folgenden Tab. 1 und 2 gelten als Beispiel. Wegen des eindeutigen Ausfalls der Versuchsreihen und aus Gründen der Raumersparnis erübrigt es sich, weitere Tabellen einzufügen. Sogar die beiden Schafstämme waren immunbiologisch verschieden!

Tabelle 1.

Maus	Tag 1	2	3	4	6		7	8	9	10
1	Vorinfektion mit Stamm „Rind“	(+)	++ Arsacetin 1 : 100, 0,5 ccm pro Maus	Arsacetin 1 : 100, 0,5 ccm pro Maus	0	Nachinfektion mit Stamm „Rind“	0	0	0	0
2		(+)	++		0		0	0	0	0
3		(+)	++		0		0	0	0	(+)
4		(+)	++		0		0	0	0	0
5		(+)	++		0		0	0	0	0
6		(+)	++		0		0	0	0	0
7		(+)	++		0	„Schaf“	(+)	+	++	†
8		(+)	++		†		·	·	·	·
9		(+)	++		0		0	+	++	†
10		(+)	++		0		(+)	+	++	†
11		(+)	++		0		+	++	†	·
12		(+)	++		0		+	(++)	++	†
13		(+)	++		0	„Hund“	+	++	†	·
14		(+)	++		0		+	++	†	·
15		(+)	++		0		(+)	++	†	·
16		(+)	++		0		+	++	†	·
17		(+)	++		0		(+)	(++)	++	†
18		(+)	++		0		+	++	†	·
19		(+)	++		0	„Kaninchen“	(+)	++	†	·
20		(+)	++		0		+	++	†	·
21		(+)	++		0		+	++	†	·
22		(+)	++		0		+	++	†	·
23		(+)	++		0		+	++	†	·
24		(+)	++		0		+	++	†	·
25		(+)	++		0	„Meerschw.“	(+)	+	++	†
26		(+)	++		0		+	(++)	++	†
27		(+)	++		0		+	++	†	·
28		(+)	++		0		(+)	+	++	†
29		(+)	++		0		+	++	†	·
30		(+)	++		0		(+)	†	·	·
31		(+)	++		0	„Maus“	(+)	+	++	†
32		(+)	++		0		0	0	0	0
33		(+)	++		0		+	+	++	†
34		(+)	++		0		(+)	+	++	†
35		(+)	++		0		(+)	+	++	†
36		(+)	++		0		(+)	++	++	†

Zur Erzielung einer guten Grundimmunität muß ein Trypanosomenstamm geeignet sein. Nicht jeder Stamm entspricht dieser Forderung. So lieferte im Vergleich zu den anderen Stämmen der Stamm „Hund“ und „Kaninchen“ minderwertige Immunität. Ein Teil der mit jenen Stämmen geimpften und nach Abheilung nachinfizierten Mäuse konnte — allerdings nach einer stark verzögerten Inkubation — wiederinfiziert

Tabelle 2.

Maus	Tag 1	2	3	4	6		7	8	9	10
1	Vorinfektion mit Stamm „Maus“	(+)	++	Arsacetin 1 : 100, 0,5 ccm pro Maus	0	Arsacetin 1 : 100, 0,5 ccm pro Maus	(++)	++	†	.
2		(+)	++		0	Nachinfektion mit Stamm „Rind“	(++)	++	†	.
3		(+)	++		0		(+)	(++)	++	†
4		(+)	++		0		+	(++)	++	†
5		(+)	++		0		+	++	†	.
6		(+)	++		0		(+)	+	++	†
7		(+)	++		0	„Schaf“	+	++	†	.
8		(+)	++		0		(++)	++	†	.
9		(+)	++		0		+	++	†	.
10		(+)	++		0		+	++	†	.
11		(+)	++		0		+	++	†	.
12		(+)	++		0		+	++	†	.
13		(+)	++		0	„Hund“	+	++	†	.
14		(+)	++		0		+	++	†	.
15		(+)	++		0		†	.	.	.
16		(+)	++		0		+	++	†	.
17		(+)	++		0		+	++	†	.
18		(+)	++		0		+	++	++	†
19		(+)	++		0	„Kaninchen“	(+)	(++)	++	†
20		(+)	++		0		+	(++)	++	†
21		(+)	++		0		(+)	++	++	†
22		(+)	++		0		0	(++)	++	†
23		(+)	++		0		+	(++)	++	†
24		(+)	++		0		+	(++)	++	†
25		(+)	++		0	„Meerschw.“	(+)	+	†	.
26		(+)	++		0		(+)	+	++	†
27		(+)	++		0		(+)	(+)	++	†
28		(+)	++		0		(+)	+	++	†
29		(+)	++		0		(+)	+	++	†
30		(+)	++		0		(+)	+	++	†
31		(+)	++		0	„Maus“	0	0	0	0
32		(+)	++		0		0	0	0	0
33		(+)	++		0		0	0	0	0
34		(+)	++		0		0	0	0	0
35		(+)	++		0		0	0	0	0
36		(+)	++		0		†	.	.	.

werden. Die ersten Trypanosomen erschienen meist erst im Blute, wenn die Impfkontrollen der Infektion bereits erlegen waren.

Nach den vorliegenden Ergebnissen muß die *Laveran-Mesnil*sche Methode zur Identifizierung von Trypanosomen mit großer Vorsicht beurteilt werden. Nicht nur 3 Stämme derselben Trypanosomen*art* (Tryp. brucei) erwiesen sich immunbiologisch als verschieden, sondern auch

die Tochterparasiten desselben Trypanosomen*stammes* ließen sich bereits nach kurzem Aufenthalt in verschiedenen Tieren voneinander so differenzieren, daß sie nach der Kreuzimmunisierungsmethode wohl als verschiedene Arten angesprochen werden müßten.

Es ist nicht Zweck dieser Arbeit, den Ursachen der Erscheinung nachzugehen. Schon *Robert Koch* machte auf das labile Verhalten der Trypanosomen aufmerksam; er hielt die einzelnen Arten für noch nicht fest bestimmt und im Werden begriffen. Ferner wissen wir, daß Rezidivstämme immunbiologisch voneinander verschieden sind (*Ehrlich*, *Levaditi* und deren Mitarbeiter, *Neumann*, *Braun* und *Teichmann*, *Ritz*). Uns kommt es hier auf die *praktische Bedeutung* der Tatsache für die Klassifizierung der Trypanosomen an. Nach der Ansicht von *Kleine* treffen wir unter natürlichen Verhältnissen nur auf „Rezidivstämme". Die durch den Stich der Glossinen infizierten Tiere bergen nur sog. Rezidivstämme in sich, denn in dem Augenblick, wo die Trypanosomen in den Tierkörper gelangen, beginnen im Kampfe mit den Abwehrkräften des Körpers die Modifikationen der Parasiten. Daß aber die immunbiologischen Modifikationen der Trypanosomenstämme nicht erst bei den Rezidiven auftreten, werde ich in einer weiteren Arbeit zeigen.

(Aus dem Institut „Robert Koch".)

Heilversuche an Mäusen mit Goldpräparaten.

Von

O. Schiemann und A. Feldt.

Unsere Versuche betreffen die Frage, ob Goldverbindungen imstande sind, akut verlaufende bakterielle Infektionen im Tierversuch zu beeinflussen. In der Tat haben wir derartige Wirkungen auf mehrere Septicämieerreger festgestellt.

1. Versuche mit Rotlauf- und Mäusetyphusbacillen.

Es wurde zunächst sowohl die Infektion wie auch die Behandlung intraperitoneal ausgeführt; die Behandlung erfolgte dabei 30′ nach der Infektion. Bei dieser Versuchsanordnung ist die desinfizierende Wirkung eines Mittels außerordentlich erleichtert, da nach so kurzer Zeit auch Septicämieerreger nur in geringer Zahl in die Blutbahn und die Organe eingedrungen sind, zum größten Teil aber noch annähernd von der ganzen Konzentration des Mittels erreicht werden. Es erwies sich z. B. in früher mitgeteilten Versuchen von *Schiemann*, daß Sublimat unter diesen Umständen eine Infektion mit Friedländerbacillen bei der Maus zu kupieren imstande war. Auch konnten bei geringer Infektionsdosis Streptokokkeninfektionen der Maus auf diese Weise durch Trypaflavin geheilt werden, während diese Infektion bei subcutaner Anwendung des gleichen Mittels nur ausnahmsweise zu beeinflussen ist.

Bei dieser Versuchsanordnung konnten wir in 2 Versuchen *mit Rotlaufbacillen*, in denen die Kontrollen mit der gleichen sowie mit der 100mal kleineren Infektionsdosis 4 Tage nach der Infektion starben, durch Behandlung mit 1 : 500 Sanocrysin von 9 Tieren 3 dauernd am Leben erhalten, 3 starben um 2—4 Tage verzögert, 3 mit den Kontrollen an der Infektion. Kleinere Dosen Sanocrysin bewirkten nur Verzögerung bei der Mehrzahl der Tiere. In einem dritten Versuch, in dem die Kontrollen bereits nach 2 Tagen der Infektion erlagen, bewirkte dagegen 1 : 1000 Sanocrysin eine Verzögerung bei allen 4 geprüften Tieren, und zwar 2mal um 3, je 1mal um 2 und 1 Tag, während nach 1 : 500 Sanocrysin von 4 Tieren 3 nur um einen Tag verzögert und eins mit den Kontrollen starb. Hier hatte also bei der schwereren, schneller

verlaufenden Infektion die kleine Dosis Sanocrysin besser gewirkt. Im ganzen wurden durch 1:500 Sanocrysin von 13 Tieren 3 gerettet, 6 starben verzögert; von 10 mit 1:1000 behandelten starben 7 verzögert, 3 mit den Kontrollen, 3 mit 1:1500 starben verzögert.

Ein Versuch mit *Pneumokokken* (Stamm Wa Typ I) ergab nur leichte Verzögerung, ausgesprochener bei der kleinen Dosis 1:1000 Sanocrysin. Vollständig negativ fiel ein Versuch an 8 Tieren mit *Bacillus Friedländer* aus.

Mit einer gewissen Regelmäßigkeit trat in unseren Versuchen mit *Mäusetyphusbacillen* eine bessere Wirkung der kleineren Dosis zutage. Es starben bei ip. Infektion mit dem hochvirulenten Stamm *Ellinger* die Kontrollen nach 4—5 Tagen, 4 mit 1:500 Sanocrysin ip. behandelte Mäuse mit den Kontrollen, von 8 mit 1:1000 behandelten überlebte eine Maus und 3 starben um 1 Tag verzögert, von 4 mit 1:2000 behandelten starb eine um 1 Tag verzögert. In den beiden Versuchen mit dem weniger virulenten Stamm *Löffler* (Tod der Kontrollen nach 5—6 Tagen) wurden je 8 Tiere mit 1:500 und mit 1:1000 Sanocrysin behandelt, von ersteren starben 2 mit den Kontrollen, je eins um 4 und 2, 4 um einen Tag verzögert, die Dosis 1:1000 rettete 3 Tiere und ließ 2 um 1—2 Tage verzögert, 3 mit den Kontrollen sterben. Im ganzen starben von 12 mit 1:500 Sanocrysin behandelten Mäusen 6 verzögert, 6 mit den Kontrollen, von 16 mit 1:1000 behandelten wurden 4 gerettet, 5 starben verzögert, 7 mit den Kontrollen, von 4 mit 1:1500 behandelten starb 1 verzögert, 3 mit den Kontrollen. Auch hier starben, wie in den übrigen bisher mitgeteilten Versuchen sämtliche mit der 10- und 100fach kleineren Dosis infizierten Kontrollen.

2. Bemerkungen über den Effectus contrarius bei großen Dosen (Zonenphänomen).

Analoge Beobachtungen über bessere Wirkung kleinerer Dosen eines Therapeuticums sind bereits von *Baumgarten* bei Behandlung cholerainfizierter Mäuse und Meerschweinchen mit Trypaflavin und von *Felton* und *Dougherty* an Ammoniumderivaten des Hydrochinins in Tierversuchen an Mäusen mit Pneumokokken gemacht worden. Auch in Versuchen mit verschiedenen anderen Bakterien, die von *Schiemann* mitgeteilt worden sind, trat zuweilen, aber nicht regelmäßig das paradoxe Phänomen auf, daß größere Dosen von Trypaflavin die Tiere an der Infektion sterben ließen, während kleinere sie retteten. *Schiemann* nannte das Phänomen „Effectus contrarius bei *großen Dosen*“ im Gegensatz zu dem von *Ehrlich* beschriebenen Effectus contrarius bei kleinen Dosen, welch letzterer auftritt, wenn ein Mittel in so kleinen Dosen gegeben wird, daß nicht eine Schädigung, sondern ein Wachstumsreiz auf die Erreger ausgeübt wird (*Ehrlich*, Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung

1909, *Ehrlich-Hata*, Chemotherapie der Spirillosen, S. 14 und 159). Nach *Schiemann* liegt im Falle des Effectus contrarius bei großen Dosen vielleicht eine Schädigung des Organismus vor, wodurch er in seiner Mitwirkung bei der Vernichtung der Mikroorganismen gehindert wird; daneben muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß sich das Chemikale im vergifteten Organismus anders zwischen Erreger und Organzellen verteilt, so daß es von Körperzellen stärker angezogen wird als im gesunden Zustand. Dasselbe nehmen *Mayer* und *Zeiss* an, die bei Heilversuchen mit Beyer 205 an trypanosomeninfizierten Mäusen analoge Beobachtungen gemacht haben. Für die Versuche von *Baumgarten* mit Cholerabacillen, wobei Infektion und Behandlung ip. erfolgte, wurde darüber hinaus angenommen, daß infolge Abtötung der Bacillen Endotoxine frei werden. *Felton* und *Dougerthy* sprechen einfach von einem „*Zonenphänomen*", indem sie feststellen, daß unterhalb der für normale Tiere toxischen Dosis ihrer Mittel eine toxische Zone lag, die sich dadurch offenbarte, daß pneumokokkeninfizierte Mäuse, mit solchen Dosen behandelt, an der Infektion zugrunde gingen, während die Mittel in geringeren Dosen bei der gleichen Infektion Heilung bewirkten. Auch diese Autoren wendeten wie *Baumgarten*, ihre Mittel ip. bei ip. Infektionen an. Optochin besaß das Zonenphänomen bei dieser Anwendung nach Beobachtung der Autoren in geringerem Grade als die Hydrochininpräparate.

Das Besondere dieses Zonenphänomens besteht also darin, daß bei zu großen Dosen nicht nur eine Vergiftung eintritt, sondern auch die Wirkung auf die Parasiten ausbleibt. Daß infizierte Tiere gegen die Giftwirkung von Chemikalien empfindlicher sind als normale, geht schon aus den Beobachtungen von *Ehrlich* und *Hata* hervor, die eine gesteigerte Empfindlichkeit spirochäteninfizierter Hühner gegen Salvarsan und Atoxyl feststellten (*Ehrlich-Hata*, S. 43 und 59), ferner auch aus dem später mitgeteilten Versuch mit Erysipelstreptokokken, wo Sulfoxylat und Sanocrysin in Dosen, wie sie sonst vertragen werden, bereits in einigen Stunden den Tod herbeiführten. In diesem Versuch war allerdings eine sehr große Bakterienmenge (0,2 ccm Kultur) zur Infektion benutzt worden. In den Versuchen mit Rotlaufbacillen trat das Zonenphänomen nur in einem Versuch mit einer besonders virulenten Kultur hervor, die bereits in 2 Tagen die Kontrollen tötete, obgleich die absolute Menge (0,000 001 ccm) in diesem Falle sehr gering war. Jedenfalls lehren diese Beobachtungen, daß es sich dabei um ein allgemein verbreitetes Phänomen handelt und daß bei der Wirkung der Chemotherapeutica noch Vorgänge mitspielen, die zunächst noch nicht genügend geklärt sind.

Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhange die Anschauungen von *Walbum*, zumal dieser Autor auch über — allerdings erfolglose — Experimente mit *Goldpräparaten* an Streptokokken infizierten Mäusen be-

richtet hat. *Walbum* hat bekanntlich gefunden, daß Metallsalze, vor allem Mangan- und Berylliumsalze, immunisierten Tieren (Pferden und Ziegen) iv. injiziert, unter gewissen Umständen einen starken Anstieg des Antikörpergehaltes des Blutes bewirken. Die Beobachtungen beziehen sich auf Antitoxine (Diphtherie) und Agglutinine (Coli).

Nun hat neuerdings *Walbum* seine Forschungen erweitert, indem er feststellte, daß auch bactericide Antikörper, Bakteriotopine und komplementbindende Antikörper in der gleichen Weise zur Sekretion angeregt werden; ferner aber hat er die Einwirkung der Metallsalze auf den Verlauf einer Infektion studiert. Hierbei wurden in der Tat Erfolge erzielt, so wurden durch Caesium und Iridium Mäuse, die mit Ratinbacillen infiziert waren, geheilt. Ferner konnten 4 von 10 Mäusen, die mit virulenten Streptokokken infiziert waren, durch iv. Manganinjektionen geheilt werden. Die Versuchsanordnung ist hier nicht näher angegeben. Ebenso konnten Kaninchen, die mit tödlichen Dosen von avirulenten Strepto- und Staphylokokken infiziert waren, durch Mangan gerettet werden, dagegen gelang es *Walbum* nicht, mit Goldpräparaten (Goldchlorid, Dosierung nicht angegeben) Streptokokken infizierte Tiere zu heilen, nur wenn er das Gold in Verbindung mit Chininpräparaten injizierte, ergaben sich Heilwirkungen.

Walbums Ansicht nach bietet ein Metallsalz nur dann Aussicht auf erfolgreiche Behandlung einer Infektion, wenn es in *geringerer* Dosis als die, in der es den *Ehrlich*schen Effectus contrarius — durch Wachstumsreiz auf den Erreger — erzeugt, noch den Organismus zur Antikörperproduktion reizt. Warum dann die Ratinbacilleninfektion nur durch Caesium und Iridium, nicht durch Mangan beeinflußt wird, erscheint allerdings unerklärt, da der Nachweis fehlt, daß Mangan in den angewandten Mengen auf Ratinbacillen einen Wachstumsreiz ausübt. Auf Grund der Mitteilungen *Walbums* haben wir bisher nur einen Versuch gemacht, in welchem je 3 Mäuse 3 Stunden nach der Infektion mit Streptokokken 0,2 ccm 1 : 2000 und 1 : 20 000 Manganchlorür iv. erhielten. Der Versuch ist gleichzeitig mit dem in Versuch 7, Tab. 1 ausgeführt worden und ergab keinen Einfluß der Behandlung, unsere Goldpräparate wirkten also besser als Mangan. Natürlich ist ein Versuch nicht beweisend, besonders da es sich nach *Walbum* um Auffindung einer bestimmten optimalen Menge des wirksamen Mittels handelt; man wird also genauere Mitteilungen *Walbums* abwarten müssen.

3. *Versuche mit Streptokokkenallgemeininfektion.*

Ein Versuch mit ip. Infektion und ip. Behandlung durch Sanocrysin fiel bei dem hochvirulenten Stamm Streptokokkus Aronson völlig negativ aus. Dagegen wurden sämtliche 8 Tiere, die mit einem aus Puer-

peralfieber isolierten Streptokokkenstamm (Streptokokkus Krüger) infiziert waren, gerettet. Dieser Stamm tötete ip. mit 0,0001 ccm nach 1, mit 0,00001 nach 2 Tagen, die mit 0,000001 infizierte Kontrolle blieb am Leben. Der Erfolg ist also zum Teil durch die milde Infektion zu erklären, immerhin war der Verlauf der Infektion bei den Kontrollen recht schnell. Dieser prompte Heilerfolg veranlaßte uns, weitere Versuche mit Streptokokken anzustellen, wobei wir außer dem Sanocrysin noch einige andere, neuerdings nach Angabe von *Feldt* in der Chemischen Fabrik auf Aktien *Schering* hergestellten Goldpräparate[1]), sowie Trypaflavin und Rivanol zum Vergleich heranzogen.

Die Versuche wurden zum größten Teil mit dem erwähnten Streptokokkus Krüger angestellt, die Versuchsbedingungen aber insofern verschärft, als wir einerseits durch Passagen die Virulenz des Stammes zu erhöhen versuchten, andererseits aber die lokale Behandlung aufgaben und die ip. Infektion durch subcutane und intravenöse Behandlung zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion zu beeinflussen suchten. Wir teilen die Versuche in 2 Tabellen mit, von denen die erste, die vergleichend mit den verschiedenen Goldpräparaten angestellten Versuche wiedergibt, während die zweite einen Vergleich der beiden Acridinpräparate mit den Goldmitteln gestattet.

Bezüglich der chemischen Konstitution der neuen Goldpräparate Sulfocrysolgan, A_{37} und Sulfoxylat I und II sei auf obige Mitteilung von *Feldt* hingewiesen. Es sei hier nur hervorgehoben, daß es gelungen ist, die Giftigkeit der Goldverbindungen für den tierischen Organismus weitgehend herabzusetzen, so daß Sulfocrysolgan in der Menge von 1 ccm 1:300 iv. pro 20 g Maus angewandt werden konnte; die Konzentration 1:200 tötete ein normales Tier in 8 Tagen. A_{37} wurde noch 1:200, Sulfoxylat I und II auch 1:100 iv. so gut vertragen, daß die Mittel in diesen Mengen auch bei infizierten Tieren angewendet werden konnten (ausgenommen ein Fall mit sehr großer Infektionsdosis).

Demgegenüber wird von gesunden Tieren Sanocrysin in der Regel erst 1:500 iv. vertragen, bei ip. Applikation starb je eine mit 1:100, 1:200 und 1:300 Sanocrysin injizierte Maus nach 1, 2 bzw. 3 Tagen, 1:400 wurde vertragen. Subcutan wurde auch 1:200 Sanocrysin vertragen, erst 1:100 verursachte Tod in 24 Stunden.

Bei subcutaner Anwendung der Goldpräparate in wässeriger Lösung erhält man starke Nekrosen, daher haben wir die Präparate in Kochsalzlösung injiziert, wobei keine Nekrosen auftraten. Auch die intravenösen und ip. Versuche sind meist mit in NaCl-Lösung gelösten Präparaten angestellt worden.

[1]) Vgl. die Mitteilung von *Feldt*, Chemotherapeutische Versuche mit Gold. Klin. Wochenschr. 1926.

Tabelle 1. *Wirkung der Goldpräparate bei subcutaner und intravenöser Behandlung von Mäusen nach ip. Infektion mit 0,0001 Streptokokkus Krüger.*

†₂ bedeutet: die Maus stirbt 2 Tage nach der Infektion an Streptokokken. 3 : 1 (1) bedeutet: von 3 behandelten Tieren wird 1 gerettet, 1 stirbt verzögert an der Infektion.

	1 17. IX.	2 6. VIII.	3 6. XI.	4 6. XI.	5 11. IX.	6 6. VIII.	7 1. XII.	8 6. XI.	9 6. XI.
	Subcutane Behandlung				Intravenöse Behandlung				
	sofort	nach 80 Min.	nach 5 Std.	nach 24 Std.	sofort	nach 80 Min.	nach 8 Std.	nach 5–6 Std.	nach 24 Std.
Sanocrysin 1 : 300	·	·	2 : 1(1)	2 : 1(1)	·	·	·	·	·
„ 1 : 500	2 : 2	2 : 0 (1)	2 : 0(2)	2 : 2	2 : 1	2 : 0 (2)	3 : 1 (2)	·	·
„ 1 : 800	2 : 1 (1)	·	·	·	·	2 : 0	·	·	·
„ 1 : 1000	·	·	·	·	·	·	3 : 1 (2)	·	·
Sulfocrysolgan 1 : 100	2 : 1	2 : 1 (1)	·	·	·	·	·	·	·
„ 1 : 200	2 : 2	2 : 1 (1)	·	·	·	·	·	·	·
„ 1 : 300	·	·	·	·	2 : 0 (1)	2 : 0 (1)	·	·	·
„ 1 : 500	2 : 2	2 : 1	·	·	2 : 0 (2)	2 : 0 (1)	·	·	·
„ 1 : 800	2 : 2	·	·	·	2 : 1 (1)	2 : 0	·	·	·
Sulfoxylat I 1 : 100	·	·	·	·	·	·	·	2 : 1 (1)	2 : 0 (2)
„ I 1 : 200	·	·	2 : 1(1)	2 : 0 (2)	·	·	·	·	·
„ I 1 : 500	·	·	2 : 1(1)	1 : 1	·	·	3 : 0 (3)	·	·
„ I 1 : 1000	·	·	·	·	·	·	3 : 0 (2)	·	·
Sulfoxylat II 1 : 100	·	·	·	·	·	·	3 : 3	·	·
„ II 1 : 500	·	·	·	·	·	·	3 : 1 (2)	·	·
„ II 1 : 1000	·	·	·	·	·	·	3 : 0 (3)	·	·
A_{37} 1 : 200	·	·	·	·	·	·	·	2 : 2	2 : 2
Kontrollen, Inf. 0,000 1 ccm	$†_1$	$†_1$ $†_2$	$†_2$ $†_2$		$†_1$ $†_3$	$†_1$ $†_2$	$†_1$ $†_1$ $†_1$	$†_2$ $†_2$	
„ 0,000 01 ccm	$†_2$ $†_6$	$†_1$ $†_1$	lebt, lebt		$†_3$ $†_3$	$†_1$ $†_1$	$†_1$ $†_2$ $†_2$	lebt, lebt	
„ 0,000 001 ccm	$†_2$ lebt	$†_2$ $†_2$	lebt, lebt		$†_1$ $†_4$	$†_2$ $†_2$	$†_1$ $†_2$ $†_2$	lebt, lebt	

Übersichtstabelle 1a.

Erfolge bei	subcutaner Behandlung		intravenöser Behandlung	
Sanocrysin sc. 1 : 300—800 „ iv. 1 : 500—1000	14 : 7 (6)	35 : 20 (12)	12 : 3 (6)	47 : 13 (25)
Sulfocrysolgan sc. 1 : 100—800 „ iv. 1 : 300—800	14 : 10 (2)		12 : 1 (6)	
Sulfoxylat I sc. 1 : 200—500 „ I iv. 1 : 100—1000	7 : 3 (4)		10 : 1 (8)	
Sulfoxylat II sc. · „ II iv. 1 : 100—1000	·		9 : 4 (5)	
A_{37} sc. · A_{37} iv. 1 : 200	·		4 : 4	

Tab. 1 gibt in 9 Versuchen einen Vergleich der subcutanen und intravenösen Anwendung und der Erfolge von 5 verschiedenen Goldpräparaten, wobei die Infektion (mit Streptokokkus Krüger) stets ip. ausgeführt war.

Da der Stamm Krüger erst im Laufe der Versuche zu höherer Virulenz angezüchtet wurde, so sind die Erfolge der Mittel nur in den gleichzeitig angestellten Versuchen vergleichbar. In Versuch 2 und 6, die gleichzeitig angestellt wurden, sowie in Versuch 7 war die Virulenz des Stammes recht hoch. Auch die 100 mal geringere Dosis tötete noch in 2 Tagen die Kontrollen. Auch in Versuch 5 war die 100 mal geringere Infektion noch sicher tödlich, wenn auch eine so infizierte Maus erst in 4 Tagen einging, in Versuch 1 überlebte eine Kontrolle mit 100 mal kleinerer Infektion und eine mit einer 10 mal kleineren Infektionsmenge infizierte starb erst in 6 Tagen. In den Versuchen 3 und 4, bzw. 8 und 9 die gemeinsame Kontrollen haben, war die 10 mal kleinere Infektion nicht mehr tödlich, die zur Infektion der behandelten Mäuse benutzte Kulturmenge tötete aber beide Kontrollen am 2. Tage. Ein Mittel, A_{37}, wurde nur bei dieser schwachen Infektion geprüft. Trotzdem ist es bemerkenswert, daß hierbei nicht nur nach 5—6, sondern auch nach 24 Stunden post infectionem die Heilung gelang. Aber auch Sanocrysin und Sulfoxylat erzielten unter diesen Bedingungen gute Erfolge. Auffallend ist, daß 1 : 500 Sanocrysin in Versuch 4 nach 24 Stunden sc. beide behandelten Mäuse rettet, während es bei derselben Infektion nach 5 Stunden (Versuch 3) nur eine Verzögerung erreicht. Bei Vergleich der Versuche 1 und 5 einerseits, 2 und 6 andererseits mit stärkerer Infektion scheint sofortige Behandlung bessere Erfolge zu haben, als nach 30 Minuten, jedoch war die Infektion in Versuch 2 und 6 stärker als in 1 und 5. Jedenfalls ergab sich aber in Versuch 7, daß auch eine sehr schwere Infektion noch nach 3 Stunden durch Sanocrysin und Sulfoxylat I und II geheilt werden konnte. Die Dosis 1 : 100 des letzten Mittels rettete sogar alle 3 behandelten Tiere. In diesem Falle ist die Abstufung des Mittels zugunsten der größeren Menge Sulfoxylat ausgefallen.

Im ganzen wurde ein größerer Teil der subcutan behandelten Tiere gerettet als bei intravenöser Behandlung; von insgesamt 35 subcutan behandelten wurden gerettet 20, 12 starben verzögert, 3 mit den Kontrollen. Dabei ist in Versuch 3 und 4 je 1 mit 1 : 300 Sanocrysin behandeltes Tier als gerettet gezählt, trotzdem die beiden Tiere 2 Tage nach den Kontrollen starben, sie enthielten aber bei der Sektion keine Streptokokken; wahrscheinlich sind sie der Giftwirkung erlegen.

Von 47 intravenös behandelten Tieren wurden 13 gerettet, 25 starben verzögert, 9 mit den Kontrollen. Je eine mit Sulfoxylat I 1 : 100 im Versuch 8 und eine mit A_{37} im Versuch 9 behandelte Maus starben 4 bzw. 1 Tag nach den Kontrollen ohne Streptokokken. Die geretteten Tiere wurden meist nach 10 Tagen getötet.

Insgesamt sind bei der meist milden Infektion von 82 behandelten Tieren 33 gerettet, 37 starben verzögert, 12 mit den Kontrollen.

Tabelle 2. *Vergleich der subcutanen und intravenösen Behandlung mit Goldpräparaten und Acridinstoffen. Infektion ip. 0,0001 Serumbouillonkultur von Streptokokkus Krüger.*

	1 Nach 30 Min. sc.	2 Nach 5 Std. iv.
Sanocrysin 1 : 300	3 : 2 (1)	•
„ 1 : 500	3 : 3	3 : 0 (3)
Sulfoxylat I 1 : 100	•	3 : 1 (1)
„ I 1 : 200	3 : 1 (2)	3 : 1 (1)
„ I 1 : 500	3 : 2 (1)	3 : 1 (1)
A_{37} 1 : 200	•	3 : 0 (3)
A_{37} 1 : 500	•	3 : 1 (1)
Rivanol 1 : 1000	3 : 0	•
„ 1 : 2000	3 : 1 (1)	•
„ 1 : 3000	3 : 0	3 : 0
„ 1 : 4000	•	3 : 0
Trypaflavin 1 : 2000	3 : 0	•
„ 1 : 3000	3 : 0	•
„ 1 : 6000	3 : 1	3 : 0
Kontrollen: 0,000 1 ccm	$†_2$ $†_2$	$†_1$ $†_1$ $†_2$
„ 0,000 01 ccm	$†_2$ $†_3$	$†_1$ $†_1$ $†_1$
„ 0,000 001 ccm	$†_3$ $†_3$	$†^1$ $†^1$ $†_2$

Tabelle 2a.

Erfolg bei	sc. Behandlung nach ½ Std.		iv. Behandlung nach 5 Std.	
Sanocrysin sc. 1 : 300—500 „ iv. 1 : 500	6 : 5 (1)	12 : 8 (3)	3 : 0 (3)	18 : 4 (10)
Sulfoxylat I sc. 1 : 200—500 „ iv. 1 : 100—500	6 : 3 (2)		9 : 3 (3)	
A_{37} iv. 1 : 200—500	•		6 : 1 (4)	
Rivanol sc. 1 : 1000—3000 „ iv. 1 : 3000—4000	9 : 1 (1)	18 : 2 (1)	6 : 0	9 : 0
Trypaflavin sc. 1 : 2000—6000 „ iv. 1 : 6000	9 : 1		3 : 0	

Tab. 2 gibt einen Versuch mit subcutaner Behandlung 30 Minuten nach ip. Infektion mit Streptokokkus *Krüger* und einen mit intravenöser Behandlung 5 Stunden nach gleicher Infektion wieder, wobei 3 Goldpräparate sowie Rivanol und Trypaflavin geprüft wurden. In Versuch 1 starb eine von den beiden durch 1 : 300 Sanocrysin geretteten Mäusen intercurrent ohne Streptokokken. In diesem Versuch wurde trotz hoher Virulenz des Infektionsmaterials auch von den beiden Acridinmitteln je 1 Maus gerettet, Rivanol bewirkte außerdem noch eine Verzögerung, doch sind im ganzen die Ergebnisse der Goldpräparate besser.

In Versuch 2 unter sehr schweren Bedingungen, nämlich schwerer Infektion und später Behandlung, haben die Acridinpräparate bei intra-

venöser Anwendung keine Wirkung gezeigt, während Sulfoxylat und A_{37} einige Tiere retteten, bei anderen bedeutende Verzögerung bewirkten. Sanocrysin, das allerdings nur an 3 Tieren in der Konzentration 1 : 500 angewendet wurde, erzielte nur kurze Verzögerung (Tod nach 3 Tagen). 2 mit 1 : 100 A_{37} und 1 mit 1 : 100 Sulfoxylat behandelte Tiere starben ebenfalls nach 3 Tagen, je 1 mit A_{37} 1 : 200 und 1 : 500 und mit Sulfoxylat 1 : 100 behandelte nach 7, 1 mit 1 : 100 Sulfoxylat behandeltes Tier nach 6 Tagen. Im übrigen sei auf die Übersichtstabelle 2a verwiesen. Auch hier tritt die bessere Wirkung der subcutanen Behandlung, die allerdings in diesem Fall auch früher einsetzte, deutlich zutage.

Die Versuche sind noch in vieler Beziehung ergänzungsbedürftig. Es liegen zu wenig Versuche vor, um zu entscheiden, welches Goldpräparat das wirksamste ist, auch die Abstufungen der Dosen wurden nicht genügend geprüft.

Auch mit Erysipelstreptokokken ist ein Versuch an 9 Tieren angestellt worden, von denen je 1 durch 1 : 200 des Mittels A_{37} und 1 : 100 Sulfoxylat 1 gerettet wurden. Hier mußte die große Infektionsdosis 0,2 ccm Kultur angewendet werden, was zur Folge hatte, daß 2 mit 1 : 100 Sulfoxylat und 1 mit 1 : 500 Sanocrysin behandelte Tiere bereits nach einigen Stunden zugrunde gingen. Leider war der Stamm so wenig virulent, daß er in so großer Menge injiziert werden mußte. Einen weiteren Beitrag zu der Frage, inwieweit die Goldpräparate besser gegen Streptokokkensepsis wirken, als Trypaflavin und Rivanol, von denen experimentell bisher nur bei lokaler nicht bei Allgemeinbehandlung ein Erfolg erzielt worden ist, bringen die nachstehenden Versuche mit einem maximal virulenten Stamm.

4. Heilversuche bei Wundinfektion mit Streptokokken.

Die Versuche, zu denen der hochvirulente Streptokokkus *Aronson* benutzt wurde, sind in den Tab. 3 und 4 dargestellt. Da bei Wundinfektionen mit diesem Streptokokkus im *Schiemann*schen Laboratorium die Erfahrung gemacht worden war, daß zwar kleine Mengen (oft noch $^1/_{100\,000}$ Tropfen) sicher tödliche Infektionen hervorriefen, daß aber je kleiner die Menge des Infektionsmaterials war, die Infektion einen um so langsameren Verlauf nahm, so ist anzunehmen, daß beim Eindringen der Bakterien auf diesem Wege die Abwehrkräfte des Organismus besser zur Wirkung kommen. Da ferner diese Art der Infektion mehr dem Verlauf einer menschlichen Erkrankung entspricht, als die Injektion einer Reinkultur in die Bauchhöhle, so erschien es angezeigt, die Wirksamkeit der neuen Präparate auf diese Weise zu prüfen.

Es wurde in der üblichen Weise am Rücken der Maus in der Nähe der Schwanzwurzel eine Hautfalte von ca. $1^1/_2$ cm Länge mit der Pinzette aufgehoben und mit der Schere abgeschnitten. Darauf wurde 1 Tropfen verdünnter Kultur auf die Wunde gebracht und mit der Kuppe eines kleinen

Reagensgläschens 20 Sekunden lang eingerieben. Nach $^1/_2$—1 Stunde erfolgte die subcutane Behandlung mit Sanocrysin einerseits, Trypaflavin und Rivanol andererseits. Zum Vergleich wurden ferner noch Versuche mit allen 3 Mitteln in der Weise angestellt, daß die infizierte Wunde 1 Stunde nach der Infektion 1 mal mit je 2 ccm der Lösungen der betreffenden Mittel (bzw. die Kontrollen mit Kochsalzlösung) kurz gespült wurden. Letztere Versuche sind in Tab. 4 wiedergegeben. Die Versuche 2 in Tab. 3 und 4 sind gleichzeitig mit der gleichen Kultur gemacht worden, die Infektionsdosis war aber bei dem Spülungsversuch wie auch in den früheren Versuchen über Wunddesinfektion von *Schiemann, Wreschner, Weise, Nakamura* erheblich stärker. In Versuch 1 und 3 der Tab. 3 sind die als gerettet gezählten Mäuse bei der Dosis 1 : 200 Sanocrysin alle 3 am 5. Tage ohne Streptokokken gestorben. Offenbar ist diese Dosis für derart infizierte Tiere meist toxisch. Kleinere Dosen waren bei Sanocrysin aber ebenfalls wirksam, 1 : 300 erzielte zwar nur eine Verzögerung, dagegen rettete 1 : 500 in Tab. 3, Versuch 1 alle beide, in Versuch 2 und 3 die Hälfte der behandelten Tiere. Die Acridinpräparate sind nur in Versuch 2 und 3 zur Anwendung gekommen; sie erzielten in Versuch 2 nur Verzögerungen um wenige Tage, in Versuch 3 hat Rivanol 1 Tier gerettet, Trypaflavin nur eine Verzögerung bewirkt. Sanocrysin übertrifft also bei subcutaner Behandlung der Wundinfektion die beiden Acridinpräparate in seiner Wirkung. Bekanntlich ist das Rivanol von *Morgenroth* und seinen Mitarbeitern ausdrücklich zur *örtlichen* Behandlung empfohlen worden.

Tabelle 3. *Subcutane Behandlung der Wundinfektion mit Streptokokkus Aronson.*

Die Wunde wird hinten am Rücken der Maus in der Nähe der Schwanzwurzel durch Abschneiden einer $1^1/_2$ cm langen Hautfalte gesetzt und durch Einreiben der Streptokokkus-Materialen infiziert. Die Behandlung erfolgt in Versuch 1 und 2 nach $^1/_2$, in Versuch 3 nach 1 Stunde sc. an entfernt liegender Stelle, in Versuch 1 am Nacken, in Versuch 2 und 3 an der Brust. Die Dosen sind auf 20 g Maus berechnet, in Versuch 1 und 3 wurde 1 ccm in Versuch 2 von der doppelten Konzentration 0,5 ccm injiziert.

	1	2	3
	Infekt. $^1/_{1000}$ Tropfen	$^1/_{100}$ Tropfen	$^1/_{200}$ Tropfen
Sanocrysin 1 : 200	2 : 1	·	2 : 2
„ 1 : 300	·	2 : 0 (1)	·
„ 1 : 500	2 : 2	2 : 1	2 : 1
„ 1 : 1000	·	2 : 0	·
Rivanol 1 : 1000	·	2 : 0 (1)	2 : 1
„ 1 : 2000	·	2 : 0 (2)	2 : 0 (1)
„ 1 : 3000	·	2 : 0	·
Trypaflavin 1 : 2000	·	2 : 0 (1)	2 : 0 (1)
„ 1 : 3000	·	2 : 0	2 : 0
„ 1 : 6000	·	2 : 0 (1)	2 : 0
Kontrollen starben:	$\dagger_2$ $\dagger_3$	$\dagger_3$ $\dagger_3$	$\dagger_2$ $\dagger_4$
bei 10 × geringerer Infektion	$\dagger_3$	$\dagger_6$ $\dagger_6$	$\dagger_3$ (gebissen)

Tabelle 4. *Behandlung der Wundinfektion durch Spülung 1 Stunde nach Infektion.*

Infektion mit Streptokokkus Aronson, wie in Tabelle 3. Behandlung der Kontrollen durch Spülung mit NaCl-Lösung. Versuch 2 wurde gleichzeitig mit Versuch 2 der Tabelle 3 ausgeführt.

Spülung mit 2 ccm der Lösung	1 Infektion 1 Tropfen	2 $^1/_{10}$ Tropfen
Sanacrysin 1 : 100	2 : 0	2 : 0 (2)
„ 1 : 500	2 : 0	2 : 0 (2)
Rivanol 1 : 250	2 : 0	2 : 1 (1)
„ 1 : 500	2 : 0	2 : 1 (1)
Trypaflavin 1 : 500	2 : 1	2 : 2
„ 1 : 1000	2 : 0	2 : 1 (1)
Kontrollen	†$_2$ †$_2$ †$_3$	†$_2$ †$_2$

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, ist der Erfolg bei direkter Spülung der Wunde mit denselben Mitteln gerade umgekehrt. Im Versuch 1 bei sehr starker Infektion hat allein Trypaflavin 1 Tier gerettet, Rivanol und Sanocrysinspülung sind ohne Erfolg geblieben, in Versuch 2 hat Trypaflavin 3, Rivanol 2 von 4 Tieren gerettet, während Sanocrysin nur Verzögerungen von 2—3 Tagen bewirkte.

Besonders deutlich ist dieser Gegensatz zu ersehen aus der nachstehenden Übersichtstab. 4a, in welcher unter Weglassung des Versuches 1 der Tab. 3, nur die Versuche mit subcutaner und örtlicher Behandlung einander gegenübergestellt sind, in denen Sanocrysin und die Acridinpräparate gleichzeitig geprüft wurden.

Tabelle 4a. *Wundinfektion Strept. Aronson.*

	Subcutan	Spülung
Sanocrysin	8 : 4 (1)	8 : 0 (4)
Rivanol	8 : 1 (4)	8 : 2 (2)
Trypaflavin	12 : 0 (3)	8 : 4 (1)

Die Überlegenheit des Sanocrysins bei subcutaner Behandlungsweise und das umgekehrte Verhalten bei der Spülung geht daraus deutlich hervor.

5. *Versuche in vitro.*

Durch Versuche in vitro haben wir analog den Versuchen mit Acridinstoffen (*Schiemann-Baumgarten*) die Grenzverdünnungen festgestellt, in denen das Sanocrysin die Vermehrung der Bakterien in künstlichen Nährboden aufhob.

Tab. 5 gibt die Zahlen außer für die im Tierversuch geprüften Bakterien (Rotlauf-, Mäusetyphus-Friedländerbacillen, Streptokokkus Aronson, Streptokokkus Krüger, Pneumokokkus Wa) noch für Hühnercholerabacillen, Micrococcus melitensis, Bacillus abortus *Bang*, Milzbrandbacillen (sporenfrei).

Die letzten 4 Bakterien wurden nur in Bouillon, die übrigen nur z. T. in Bouillon, stets aber in 10% Serumbouillon und in reinem aktiven Kaninchen-

serum untersucht. Das Volumen war in den Versuchen mit reinem Serum 0,5 ccm, sonst 5 ccm. Die Einsaat betrug stets $^{1}/_{100}$ Tropfen Kultur. Ein Versuch mit 0,5 und 5,0 ccm Serumbouillon an Rotlauf-, Mäusetyphus- und Friedländerbacillen ergab bei gleicher Einsaat keinen Unterschied in der Wirkung des Sanocrysin. Jede Verdünnung wurde durch Zusatz von 10% der entsprechenden Verdünnungsstufe des Mittels in Wasser hergestellt. Die Versuche mit Serum sind einmal, die übrigen mehrmals wiederholt worden.

Die größten Schwankungen ergaben sich für Rotlaufbacillen, die 2 mal unter 8 Versuchen bei 1 : 100 000 in Serumbouillon noch Wachstum zeigten (stärkere Konzentrationen wurden beide Male nicht untersucht). Die übrigen Bakterien ergaben nicht sehr bedeutende Schwankungen. Auch bei Untersuchungen in Bouillon bei verschiedenen p_H waren die Schwankungen nicht sehr groß. In den Fällen, wo mehrfache Versuche mit verschiedenen Resultaten angestellt wurden, sind die äußersten Grenzwerte in Klammern unter die Durchschnittszahl gesetzt worden.

Tabelle 5. *Entwicklungshemmungsversuche mit Sanocrysin.*

	Bouillon	Serumbouillon	Kan.-Serum
Rotlaufbacillen	3 Mill. — (1 Mill. + bis 100 Mill.—)	3 Mill. — (1 Mill. + bis 100 Mill.—)	3000 —
Mäusetyphusbacillen	300 000 — (100 000 — bis 400 000 —)	30 000 — (30 000 — bis 100 000 —)	3000 —
Friedländerbacillen	300 000 — (100 000 — bis 800 000 —)	30 000 — (10 000 — bis 300 000 —)	3000 —
Streptokokken (Stamm Aronson)	·	3000 — (1000 — bis 3000 —)	1000 —
Streptokokken (Stamm Krüger)	·	10 000 — (10 000 — bis 20 000 —)	3000 —
Pneumokokken (Typ I)	·	5000 —	·
Hühnercholerabacillen	100 000 — (80 000 — bis 200 000 —)	·	·
Micrococcus melitensis	50 000 — (10 000 — bis 100 000 —)	·	·
Bac. abort. Bang	25 000 — (10 000 — bis 50 000 —)	·	·
Milzbrandbacillen (sporenfrei)	1000 —	·	·

Während in den Versuchen mit Salvarsan, Optochin, Acridin- und anderen Farbstoffen vielfach eine deutliche Parallelität zwischen Wirkung in vitro und in vivo beobachtet wurde, war das in unseren Versuchen mit Sanocrysin nicht der Fall. Vor allem aber fällt die Herabsetzung der Wirkung des Sanocrysin in reinem Serum auf, bei Rotlaufbacillen sogar um das 1000 fache. Bei Mäusetyphus und Friedländerbacillen ist die Wirkung im Serum 100 mal geringer als in Bouillon, das Wachstum dieser beiden Bakterien ist bereits in Serumbouillon 10 mal

weniger gehemmt als in Bouillon. Zum Vergleich sei angeführt, daß nach *Schiemann* und *Ishiwara* die Herabsetzung der hemmenden Wirkung von Sublimat auf Milzbrand und Rotlaufbacillen in Serum gegenüber Bouillon das 10—30fache betrug, während Salvarsan auf Rotlaufbacillen und Optochin auf Pneumokokken in aktivem Kaninchenserum sogar etwas stärker als in Bouillon einwirkte.

Auffallend ist ferner, daß die Ergebnisse in Serum für alle untersuchten Bakterien ziemlich gleich ausgefallen sind, trotzdem das Sanocrysin zu den einzelnen Bakterienarten, nach den Versuchen in Bouillon zu urteilen, verschiedene Affinität besitzt.

Schlußsätze.

Sanocrysin und mehrere andere von uns untersuchte Goldverbindungen zeigten im Versuch an Mäusen eine deutliche Heilwirkung auf akute bakterielle Infektionen.

Am stärksten wurden Streptokokken beeinflußt. Bei einem mäßig virulenten Stamm gelang die Heilung intraperitoneal infizierter Tiere noch nach einigen, gelegentlich auch nach 24 Stunden; dabei erwies sich subcutane Behandlung wirksamer als intravenöse.

Gegenüber dem höchst virulenten Streptokokkus Aronson gelang bisher eine Heilung durch subcutane Einspritzung nur, wenn die Infektion von einer Hautwunde aus geschah. Örtliche Behandlung der Wunde durch Spülung hatte nur schwachen Erfolg (Verzögerung des Todes), während Spülungen mit den Acridinverbindungen Trypaflavin und Rivanol sich in Bestätigung früherer Versuche weit wirksamer erwiesen. Umgekehrt waren diese Mittel bei subcutaner und intravenöser Anwendung den Goldpräparaten deutlich unterlegen.

Auch bei Infektionen mit Rotlauf und Mäusetyphus zeigte Sanocrysin eine Heilwirkung, wenn es kurz nach intraperitonealer Infektion ebenfalls intraperitoneal eingespritzt wurde.

Mehrfach wurde die aus Versuchen mit anderen Chemotherapeutica bekannte paradoxe Erscheinung beobachtet, daß die Erreger durch große Dosen der Mittel schlechter beeinflußt wurden als durch kleinere.

Literaturverzeichnis.

Baumgarten, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **91**, 511. 1921. — *Ehrlich*, Zeitschr. f. ärztl. Fortbild. 1909. — *Ehrlich* und *Hata*, Die experimentelle Chemotherapie der Spirillen. Berlin: Julius Springer 1910. — *Felton* und *Dougherty*, Journ. of exp. Med. 1922. — *Mayer* und *Zeiss*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **24**, 257. 1920. — *Nakamura*, Arch. f. klin. Chir. **137**, Heft 2, 1925. — *Schiemann*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 284. 1922. — *Schiemann* und *Baumgarten*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 247. 1922. — *Schiemann* und *Ishiwara*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **77**, 49. 1914. — *Walbum*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **43**, 433. 1925 und Dtsch. med. Wochenschr. 1925, S. 1188. — *Weise*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 56. 1922.

(Aus der Seuchenabteilung des Instituts „Robert Koch". — Leiter: Prof. *B. Lange.*)

Experimentelle Infektionen von Mäusen und Meerschweinchen parenteral und von den natürlichen Eingangspforten aus.

I. Mitteilung.

Versuche an Mäusen mit Milzbrand und anderen Septicämieerregern.

Von

Dr. **Yoshiho Uchida,** Kanazawa (Japan).

Die im folgenden mitgeteilten Versuche ergänzen frühere von *B. Lange, Keschischian* und *Nowosselsky,* welche zum Ziele hatten, durch vergleichende Prüfung verschiedener Infektionserreger und ihrer Invasionsfähigkeit von den wichtigsten natürlichen Eingangspforten aus bei sorgfältiger Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse bei der Infektion und der Virulenz der Erreger neue Erfahrungen zu gewinnen über eine Reihe epidemiologisch bedeutsamer Fragen, unter anderem *über die natürlichen Abwehrkräfte des Organismus und die Empfänglichkeit seiner Eingangspforten für die Infektion.*

Als Maßstab für die Wehrfähigkeit des Organismus diente dabei nicht allein die Tatsache des Angehens oder Nichtangehens der Infektion, sondern auch die Verlaufsform der zustande kommenden Erkrankung und die beim Eindringen in den Körper auf den natürlichen Wegen sich vollziehenden Schädigungen der Erreger, soweit solche durch Kultur und Tierversuch nachgewiesen werden konnten.

Aus den bisherigen zunächst nur an Mäusen angestellten Untersuchungen ergab sich nun ganz im Gegensatz zu der Monotonie der Erscheinungen bei parenteraler Infektion ein höchst mannigfaltiges, den natürlichen Verhältnissen weitgehend entsprechendes Bild.

Auf parenteralem Wege gleich hochvirulente Septicämieerreger hatten in sehr verschiedenem Grade die Fähigkeit, Mäuse von den natürlichen Eingangspforten aus zu infizieren. Die stärkste „Invasionsfähigkeit" wiesen die Mäusetyphusbakterien und die Bacillen der hämorrhagischen Septicämie (Hühnercholera-, Pasteurella-Bakterien) auf, eine mittlere Invasionsfähigkeit die Rotlaufbacillen, eine geringe die Streptokokken, die geringste die Pneumokokken.

Innerhalb der gleichen Art von Infektionserregern zeigten durchweg diejenigen Stämme bzw. Kulturen für die natürlichen Wege die stärkste Invasionsfähigkeit, welche auch bei parenteraler Verimpfung Mäuse noch in den kleinsten Mengen sicher töteten. Dabei waren Unterschiede zugunsten „tierischer", d. h. mit tierischen Organen verimpfter Bakterien gegenüber maximalvirulenten Kulturbakterien in der Regel nicht nachzuweisen.

Die Widerstandsfähigkeit des Organismus der Maus den einzelnen geprüften Erregern gegenüber, vor allem aber auch die Resistenz der verschiedenen Eingangspforten bei Versuchen mit einer Bakterienart war individuell erheblich verschieden. So wurde bei der Inhalationsinfektion mehrfach beobachtet, daß von Mäusen, die nachweislich die gleiche Menge hochvirulenter Rotlaufbacillen, Streptokokken und Pneumokokken in die Lungen eingeatmet hatten, nur ein Teil der Infektion erlag, während ein anderer Teil verschont blieb. Noch stärker traten diese Resistenzunterschiede bei der oralen Infektion hervor, zum Teil wohl deshalb, weil es hier möglich ist, die Dosen stärker zu variieren. Derselbe Mäusetyphus-Bacillenstamm z. B., der einzelne Tiere per os noch in einer Dosis von $^1/_{100\,000\,000}$ Öse infizierte, war bei einer nicht geringen Zahl von Mäusen in einer Dosis von $^1/_{100}$ bis $^1/_{1000}$ mg anscheinend völlig wirkungslos.

Ein Vergleich der Wirksamkeit der einzelnen Erreger auf den verschiedenen Wegen ergab ferner eine besondere Disposition der Lungen für die natürliche Infektion, soweit diese überhaupt wirksam war. Erreger, die auf dem Inhalationswege leicht infizierten, hatten eine große, wenn auch deutlich schwächere Invasionsfähigkeit auch für den Verdauungstraktus (Mäusetyphus-Hühnercholerabakterien), solche, die von den Lungen aus schlecht infizierten (Streptokokken, Pneumokokken), konnten Mäuse vom Verdauungstraktus aus nicht einmal in sehr großen Mengen höchstvirulenter Kultur regelmäßig krank machen. Der Erfolg der Infektion von der unverletzten Haut aus, dessen Beurteilung natürlich für die auch per os leicht infizierenden Bakterien sehr erschwert ist, stand stets erheblich hinter dem der direkten Lungeninfektion zurück, er entsprach in der Regel demjenigen der oralen Infektion. Nur mit Rotlaufbacillen gelang die percutane Infektion leichter als die Fütterungsinfektion.

Der Krankheitsverlauf war gegenüber dem bei parenteraler Verimpfung der Erreger meist mehr oder weniger in die Länge gezogen. In dieser Tatsache und der beobachteten Schädigung der Keime bzw. Bactericidie, wie sie sich innerhalb der tierischen Lungen nachweisen ließ, dokumentiert sich der eigenartige Mechanismus der natürlichen Infektion, bei welcher im Gegensatz zur parenteralen die angreifenden Bakterien schon im Moment ihres Eindringens von den natürlichen Eingangspforten aus und dann weiterhin den Abwehrkräften des Körpers in weitem Umfange ausgesetzt sind.

Nun scheinen in bezug auf die Empfänglichkeit der Eingangspforten die Verhältnisse bei der Milzbrandinfektion grundsätzlich anders zu liegen als bei der Infektion mit Mäusetyphus-, Pasteurella-Virus, Rotlaufbacillen, Strepto- und Pneumokokken, und zwar insofern, als beim Milzbrand nach allen einschlägigen Erfahrungen *die Haut* eine hohe Empfänglichkeit zeigt, während den meisten Forschern die Infektion von Tieren *auf den anderen in Betracht kommenden natürlichen Wegen* entweder gar nicht oder nur mit auffallend großen Keimmengen gelungen ist. Allerdings bestand lange Zeit die Anschauung, daß Infektionen der Haut nur bei einer, wenn auch noch so leichten Verletzung des Organs zustande kämen; die Experimente von *Roth, Wasmuth, Fritsche* u. a.[1]) haben aber bewiesen, daß eine Milzbrandinfektion auch durch die unverletzte Haut stattfinden kann.

[1]) Literatur vgl. *Koenigsfeld*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **60**, 30. 1911.

Daß die Infektion mit Milzbrand vom *Magendarmkanal* aus wesentlich schwerer gelingt als von der Subcutis, haben schon *Robert Koch*, *Gaffky* und *Loeffler*[1]) beobachtet, in der Folgezeit ist diese Beobachtung mehrfach bestätigt worden. Trotzdem wird allgemein angenommen, daß die natürliche Ansteckung mit Milzbrand bei Tieren vorzugsweise durch den Verdauungstraktus erfolgt [*Hutyra-Marek*, *Poppe*[2])]. Beim Eindringen durch die Schleimhäute des Rachens bzw. Darms in die regionären Lymphdrüsen erleiden die Milzbrandsporen, wie neuerdings *Adler* an Mäusen nachgewiesen hat, Veränderungen ihres kulturellen Verhaltens und ihrer Virulenz.

Eine Infektion von den *Lungen* aus durch Einatmung der Erreger bzw. intratracheale Injektion soll bei Tieren nach *Buchner*, *Enderlen*, *Muskatblüth* und *Wyssokowitsch* unter geeigneten Bedingungen möglich sein. *Morse*, *Hildebrandt*, *Tschistovitsch*, *Gramatschikoff*, *Snel* und *Baumgarten*[1]) hatten bei Versuchen, Tiere von den Lungen aus zu infizieren, völlig negative Resultate, sie führen die anderslautenden Resultate von *Buchner*, *Muskatblüth* usw. auf Versuchsfehler zurück (nicht Lungeninfektion, sondern Eindringen der Milzbranderreger vom Nasenrachenraum oder von Hautverletzungen aus). Eine wichtige Stütze für die behauptete Uninfizierbarkeit der Lungen auf natürlichem Wege stellt die Beobachtung von *Gramatschikoff* und *Snel* dar, daß intratracheal injizierte Milzbrandbacillen schon sehr bald in den Lungen vernichtet werden. Vor ihrer Vernichtung erleiden sie weitgehende Schädigungen ihres morphologischen Verhaltens. Leider sind in den Arbeiten der genannten Autoren keine genauen Angaben über die *Virulenz* der von ihnen geprüften Stämme enthalten.

Einen ganz extremen Standpunkt bezüglich der experimentellen Milzbrandinfektion vertritt *Besredka*. „La sensibilité du cobaye neuf vis-à-vis du charbon repose sur celle de son revêtement cutané. Le cobaye neuf est réfractaire à l'inoculation de charbon par toute voie autre que la voie cutanée.“

Wie *Sobernheim* und *Murata* mit Recht hervorheben, ist es bei allen Versuchen, welche die Empfänglichkeit oder Unempfänglichkeit verschiedener Gewebe ermitteln wollen, ganz unerläßlich, *der Dosierung der Bakterien die größte Aufmerksamkeit zu schenken.* Dies ist aber in den meisten oben zitierten Versuchen nicht geschehen. Wahrscheinlich ist auch die Virulenz der von den einzelnen Autoren benutzten Kulturen eine verschiedene gewesen.

Bei sorgfältiger Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse konnten *Sobernheim* und *Murata* das Irrige der Anschauung *Besredkas*

---

[1]) Literatur bei *Sobernheim*, Handb. von Kolle u. Wassermann Bd. III, S. 583. 1913.

[2]) *Hutyra-Marek*, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere Bd. I, S. 1. 1922. — *Poppe*, Weichardts Ergebnisse **5**, 597. 1922.

nachweisen. Es gelang ihnen die Infektion bei Meerschweinchen auch auf intramuskulärem, intraperitonealem und intravenösem Wege. Allerdings war zur Infektion auf den beiden letzgenannten Wegen eine deutlich größere Dosis von Keimen erforderlich. Ebenso gelang die Infektion per os, wenn auch regelmäßig erst mit $^1/_{10}$ Öse Kultur.

Wenn die Untersuchungen von *Sobernheim* und *Murata* in bezug auf die vorliegende Frage auch einen entschiedenen Fortschritt bedeuten, so blieben doch manche Widersprüche in den Ergebnissen der Arbeiten älterer Forscher noch ungeklärt. *Vor allem fehlt es an quantitativ vergleichenden Untersuchungen über die Empfänglichkeit der natürlichen Eingangspforten (Haut, Darm, Lungen) für die Milzbrandinfektion.* Es schien daher von Interesse, in der Weise, wie dies von *B. Lange* und seinen Mitarbeitern mit anderen Septicämieerregern geschehen ist, die Bedeutung der natürlichen Eingangspforten auch für die *Milzbrandinfektion* vergleichend zu prüfen. Dazu benutzte ich zunächst als Versuchstier die weiße Maus. Da derartige Versuche mit Milzbrand gerade auch im Hinblick auf die Infektionen mit anderen Erregern von Wert waren, die Versuche von *B. Lange* andererseits besonders zur Bewertung der Haut als Eingangspforte nicht ausreichendes Material lieferten, habe ich in einem zweiten Teil meiner Arbeit noch eine Reihe von Experimenten mit Hühnercholera-, Rotlauf- und Mäusetyphusbacillen, Strepto- und Pneumokokken gleichfalls an Mäusen angestellt.

1. Versuche mit Milzbrandbacillen und -sporen.

Zur Infektion der Mäuse dienten 3 Milzbrandstämme, He, Y und Km. Der Stamm Y hatte die geringste Virulenz, tötete Mäuse aber subcutan bzw. intraperitoneal noch einigermaßen regelmäßig mit $^1/_{1000}$ bis $^1/_{100\,000}$ Öse. Der Stamm He war für die Maus von höchster Virulenz, für das Meerschweinchen fast avirulent, der Stamm Km nicht nur für Mäuse, sondern auch für Meerschweinchen von höchster Virulenz.

In den Versuchen wurden teils Sporen, teils Bacillen verimpft. Zunächst verwandte ich eine 24stündige Milzbrandschrägagarkultur (37°), in welcher neben Bacillen stets schon zahlreiche Sporen vorhanden waren (Tab. 1); weiterhin prüfte ich die Wirkung von Sporen (Tab. 2). Um eine ausgiebige Versporung der Kulturen zu erzielen, ließ ich sie 3 Tage bei 37°, dann mehr oder weniger lange Zeit bei Zimmertemperatur. Endlich prüfte ich Milzbrandbacillen ohne Sporen (Tab. 3). Hierzu wurden Organaufschwemmungen an Milzbrand verendeter Mäuse benutzt, in einem Versuch auch eine 24stündige Gelatinekultur, die zwar nicht frei von Sporen war, solche aber doch nur in sehr geringer Menge enthielt.

Die Virulenzprüfung der jeweilig benutzten Kulturen geschah in der Regel durch intraperitoneale Verimpfung, nur in den Versuchen 2, 15—17, 18 und 21 durch subcutane bzw. beide Arten der Verimpfung. Vorversuche hatten ergeben, daß maximal virulente Milzbrandsporen und -bacillen auch von der Bauchhöhle noch in kleinsten Mengen infizierten. Eine vergleichende Prüfung peritonealer mit der subcutanen Impfung zeigte sogar meist eine etwas stärkere Wirkung

der ersteren, welche in einer Beschleunigung des Todes bei den ip. infizierten Tieren in Erscheinung trat. Es ist demnach für den vorliegenden Zweck die Art der parenteralen Verimpfung anscheinend nicht von Bedeutung. Die Ergebnisse weiterer Versuche mit parenteraler Milzbrandinfektion der Maus werden später ausführlich mitgeteilt werden (II. Mitteilung). Bei der parenteralen Impfung ergaben sich nun nicht unerhebliche Virulenzunterschiede der benutzten Kulturen auch bei den Sporen. Die Gesetzmäßigkeit solcher Virulenzschwankungen bei ein und derselben Kultur zu ermitteln, liegt nicht im Bereiche meiner Aufgabe. Für mich war die Tatsache dieser Virulenzschwankungen ein Vorteil, da sie Gelegenheit bot, die Wirkung maximal und nicht maximal virulenter Kulturen von den natürlichen Eingangspforten aus miteinander zu vergleichen, in ähnlicher Weise, wie dies in den Untersuchungen von *B. Lange* und seinen Mitarbeitern geschehen ist.

Die Technik der percutanen, oralen Verimpfung und der Inhalationsversuche entspricht der in den Arbeiten von *B. Lange* und *B. Lange* und *Keschischian* mitgeteilten. Bei der percutanen Verabfolgung der Bakterien war die in den Tabellen angegebene Bakterienmenge in 1 Tropfen, bei der oralen in 2 Tropfen Kultur bzw. Aufschwemmung enthalten. In den Inhalationsversuchen wurden stets 2 Mäuse jeder Versuchsreihe sofort nach der Inhalation getötet, ihre Lungen zerrieben und mit dem Lungenbrei in abgestuften Verdünnungen 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64 usw. Bouillon beimpft. Die in den Tabellen angegebenen Mengen der in die Lungen inhalierten Keime entsprechen den kleinsten Mengen des Ausgangsmaterials, welche bei Verimpfung auf flüssige Kultur noch Vermehrung zeigten. Es sind dies natürlich Minimalzahlen, eigentlich liegt bei einer Wachstumsgrenze z. B. von $^1/_{256}$ die Keimzahl zwischen 256 und 1024.

In einer Reihe von Versuchen, die in die Tabellen nicht mit aufgenommen sind, wurden Milzbranderreger nicht allein in die unverletzte, sondern daneben auch *in die scarifizierte Haut* eingerieben. Die Scarification geschah dabei in der Weise, daß die kurzgeschorene Haut mit der Spitze eines Skalpells mehrmals geritzt wurde. Das Ergebnis dieser Versuche war folgendes. Fand eine Durchtrennung der Haut ohne nennenswerte Blutung statt, so erlagen die geimpften Tiere ausnahmslos noch kleinsten Mengen der Erreger, wurde aber lediglich die Epidermis aufgelockert, so war der Erfolg bei Impfung mit kleinsten Mengen keineswegs so sicher, es wurde sogar zweimal beobachtet, daß eine Maus die Verimpfung von $^1/_{100}$ Öse Kultur überlebte.

Die Tabellen lassen erkennen, daß die Infektion von Mäusen mit Milzbrand sowohl von der unverletzten Haut aus wie auch vom Intestinaltraktus und den Lungen aus gelingt, aber welch ein Unterschied in den quantitativen Verhältnissen, wenn wir die percutane mit der oralen Infektion durch sporenhaltige Milzbranderreger (Tab. 1 und 2) vergleichen! Von 13 Versuchen, in denen die Empfänglichkeit der *Haut* geprüft wurde, sind nur 3 ganz negativ ausgefallen, in 6 Versuchen (2, 3, 5, 9, 12 und 13) war die Wirkung sogar sehr stark. Es trat noch Infektion ein bei Verreibung von $^1/_{1000}$—$^1/_{200000}$ Öse in die unverletzte Haut. Demgegenüber waren von 13 Versuchen mit *oraler* Verimpfung 7, also über die Hälfte, negativ, nur in einem Versuch (10)

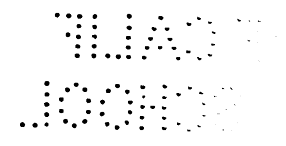


Tabelle 1. *Infektion von Mäusen mit eintägiger Milzbrandagarkultur. Bacillen in mäßigem Grade versport.*

Nr. des Versuchs	Stamm	Keimzahl pro 1 Ö. Agar-kultur	Virulenz bei parenteraler Verimpfung	Erfolg der Infektion		
				percutan	per os	per inhalationem
1	He	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ Ö. $\dagger_2$ →	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	·
2	He	100 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ Ö. $\dagger_2$ → (wahrscheinlich max.	1 Ö. 2 : 1 ($\dagger_2$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 0($\dagger_2$,$\dagger_4$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_2$) $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_5$)	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2	·
3	He	1 000 000	$^1/_{1\,000\,000}$ Ö. $\dagger_3$ (max.)	$^1/_{20}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{2000}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_8$) $^1/_{200\,000}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_{11}$)	$^1/_2$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_{11}$) $^1/_{20}$ Ö. 2 : 2	256 Keime = 6 : 6
4	He	10 000 000	$^1/_{1\,000\,000}$ Ö. $\dagger_3$	$^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	$^1/_2$ Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2	16 384 Keime = 6 : 2 ($\dagger_2$, $\dagger_3$, $\dagger_3$, $\dagger_4$)
5	He	10 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ Ö. $\dagger_2$ (max.)	1 Ö. 2 : 0($\dagger_2$,$\dagger_3$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 0($\dagger_6$,$\dagger_8$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_6$) $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 1 ($\dagger_3$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	4096—16 384 Keime = 6 : 2 ($\dagger_8$, $\dagger_{10}$, $\dagger_{11}$, $\dagger_{14}$)
6	Y	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ Ö. $\dagger_7$	1 Ö. 2 : 1 ($\dagger_7$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	·
7	Y	100 000 000	$^1/_{1000}$ Ö. $\dagger_2$ $^1/_{100\,000}$ Ö. lebt	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_7$) $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_7$)	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2	·

Bemerkungen: 2 : 0 heißt: von 2 infizierten Tieren sterben beide an Milzbrand. → heißt: Grenze nicht erreicht. $\dagger_3$ = Tod nach 3 Tagen. max. = maximal.

Tabelle 2. *Infektion von Mäusen mit mehrtägigen, stark versporten Milzbrandkulturen.*

Nr. des Versuchs	Stamm	Alter der Sporenkultur	Keimzahl pro 1 Öse Agarkultur	Virulenz bei parenteraler Verimpfung	Erfolg der Infektion		
					percutan	per os	per inhalationem
8	Km	2 Tg.	10 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ Ö. $\dagger_2$ (max.)	.	.	16 384 Keime 2 : 0 ($\dagger_3$, $\dagger_4$)
9	He	2 Tg.	100 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ $\dagger_2$ $^1/_{100\,000\,000}$ lebt	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_3$; $\dagger_4$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_3$) $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_4$: $\dagger_5$)	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	.
10	He	7 Tg.	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ Ö. $\dagger_2$ $^1/_{1\,000\,000}$ Ö. lebt	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_3$, $\dagger_6$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2: $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_3$, $\dagger_6$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_3$, $\dagger_3$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_4$; $\dagger_5$) $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_3$)	.
11	He	10 Tg.	100 000 000	$^1/_{100\,000}$ Ö. lebt	1 Ö. 2 : 1 ($\dagger_1$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2	.
12	He	14 Tg.	100 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ Ö. $\dagger_2$ (max.)	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_1$, $\dagger_2$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_2$, $\dagger_4$) $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_4$, $\dagger_4$)	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_2$, $\dagger_{10}$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2; $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2; $^1/_{10\,000}$ Ö. 2 : 2	496—16 384 Keime 6 : 4 ($\dagger_2$, $\dagger_4$)
13	He	1 Mon.	100 000 000	$^1/_{100\,000}$ Ö. $\dagger_2$ $^1/_{1\,000\,000}$ Ö. lebt	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_3$, $\dagger_4$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_3$) $^1/_{10\,000}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_7$)	1 Ö. 2 : 1 ($\dagger_3$) $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{10\,000}$ Ö. 2 : 2	.
14	He	2 Mon.	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ Ö. $\dagger_2$ $^1/_{1\,000\,000}$ Ö. lebt	1 Ö. 2 : 2 $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 0 ($\dagger_2$, $\dagger_2$) $^1/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^1/_{1000}$ Ö. 2 : 2	.

Tabelle 3. *Infektion von Mäusen mit sporenfreien bzw. nahezu sporenfreien Milzbrandbazillen.*

Nr. des Versuchs	Stamm	Verwandte Aufschwemmung	Keimzahl pro 1 Öse Kultur bzw. 1 ccm Organ-aufschw.	Virulenz bei parenteraler Verimpfung	Erfolg der Infektion		
					percutan	per os	per inhalationem
15	Km	Gelatinekultur	100 000 000	$^{1}/_{10\,000\,000}$ Ö. $\dagger_3$ →	$^{1}/_{20}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_2$, $\dagger_4$) $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	·	·
16	He	desgl.	10 000 000	$^{1}/_{100\,000}$ Ö. $\dagger_3$ $^{1}/_{1\,000\,000}$ Ö. lebt	1 Ö. 2 : 2; $^{1}/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2; $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	1 Ö. 2 : 2; $^{1}/_{10}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2; $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	64—256 Keime 6 : 6
17	Km	desgl.	10 000 000	$^{1}/_{10\,000\,000}$ Ö. $\dagger_4$ (max.)	·	1 Ö. 2 : 2	Milzbrandbacillen in d. Lungen d. Kontrollen kulturell nicht nachzuweisen. 4 : 4
18	Km	Milzaufschwemmung	10 000 000	$^{1}/_{10\,000\,000}$ ccm $\dagger_5$ (max.)	$^{1}/_{10}$ ccm 2 : 1 ($\dagger_2$) $^{1}/_{100}$ ccm 2 : 1 ($\dagger_5$)	·	·
19	He	desgl.	1 000 000 000	$^{1}/_{10\,000\,000}$ ccm $\dagger_2$ $^{1}/_{100\,000\,000}$ ccm lebt	$^{1}/_{20}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_4$) $^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	$^{1}/_{20}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	·
20	He	desgl.	100 000 000	$^{1}/_{10\,000\,000}$ ccm $\dagger_1$	$^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{10\,000}$ Ö. 2 : 2	$^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{10\,000}$ Ö. 2 : 2	Milzbrandbacillen in d. Lungen d. Kontrollen kulturell nicht nachzuweisen. 6 : 6
21	Km	desgl.	10 000 000	$^{1}/_{10\,000\,000}$ ccm $\dagger_4$ (max.)	$^{1}/_{20}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	$^{1}/_{20}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{100}$ Ö. 2 : 2 $^{1}/_{1000}$ Ö. 2 : 2	·

trat eine Wirkung ein, die sich der bei cutaner Applikation der Keime erreichten vergleichen läßt — auffallenderweise hatte die in dem gleichen Versuche ausgeführte Hautimpfung ein schlechtes Resultat — in allen anderen positiven Versuchen gelang die Infektion nur mit der enormen Dosis von $^1/_2$—1 Öse! Was die Infektion *von den Lungen aus* betrifft — daß es sich um eine solche handelt und nicht etwa um eine Infektion des Nasenrachenraums, geht aufs deutlichste aus dem äußerst dürftigen bzw. ganz negativen Erfolg der mit der gleichen Kultur an demselben Tage ausgeführten Fütterungsversuche hervor —, so sprechen die 5 Inhalationsexperimente für eine Empfänglichkeit der Lungen für die Milzbrandansteckung, *die hinter derjenigen der Haut kaum zurückbleibt*. Von 8 Mäusen, die 16 384 Keime, also etwa $^1/_{5000}$ Öse[1]) in die Lunge eingeatmet hatten, starben 6 Tiere an Milzbrandsepsis = 75%, von 12 Mäusen, die 4096—16 384 Keime inhalierten, noch die Hälfte, dagegen waren 256 Keime maximaler Virulenz von den Lungen aus unwirksam. Die kleinste, noch eben wirksame Dosis liegt aber, wie aus Inhalationsversuchen mit Milzbrandsporen von *Nowosselsky* hervorgeht, über die hier kurz berichtet werden soll[2]), etwa bei 100 Keimen = $^1/_{1\,000\,000}$ Öse. *Nowosselsky* stellte 3 Inhalationsversuche an, bei denen im ganzen 10 Mäuse 20—320 Sporen der auch von mir benutzten Kultur He in die Lungen einatmeten. 5 Mäuse wurden als Kontrollen zur Bestimmung der inhalierten Keimmenge sofort nach der Inhalation getötet. Von den 5 am Leben gelassenen Mäusen starb eine nach 13 Tagen an Milzbrandsepsis, die übrigen blieben gesund. Wahrscheinlich würde eine größere Zahl von cutanen und Inhalationsversuchen ergeben, daß unter Umständen einzelne wenige sporenhaltige Milzbrandbacillen oder freie Sporen sowohl von der Haut wie von den Lungen aus noch infizieren können.

Inhalationsversuche mit Aufschwemmungen *sporenfreier Milzbrandbacillen* hatten ein ganz negatives Resultat. Da aber auch in den Lungen der sofort nach der Inhalation getöteten Mäuse Milzbrandbacillen nur in geringer Zahl oder überhaupt nicht nachgewiesen werden konnten, muß es zweifelhaft bleiben, ob in den Versuchen genügend Bacillen in die Lungen eingeatmet wurden, und ob nicht wegen der Länge der vielfach Ketten bildenden Stäbchen die feinsten atembaren Tröpfchen bei der Verstäubung der Aufschwemmung größtenteils leer ausgegangen sind. Es kann aber auch an eine sehr schnell einsetzende Schädigung der Bacillen gedacht werden. Daß eine gewisse Zeit nach der Infektion die Bacillen Schädigungen unterliegen, ist ja durch die Versuche von *Snel*, *Gramatschikoff* u. a. sichergestellt. Wie dem auch sei, jedenfalls

[1]) 1 Öse = 100 000 000 Bakterien gerechnet.

[2]) Die Versuche sind in der Arbeit von *B. Lange* und *Nowosselsky* nicht mitgeteilt worden.

läßt sich aus den Versuchen die Frage, ob eine direkte Infektion der Lungen durch sporenfreie Bacillen möglich ist, nicht ohne weiteres mit Nein beantworten.

Betrachten wir nun die Ergebnisse der *cutanen und oralen Infektion mit sporenfreien Milzbrandbacillen* (Tab. 3) und vergleichen sie mit denen der Tabellen 1 und 2, so läßt sich folgendes schließen: Während die Infektion der Haut mit mehr oder weniger sporenhaltigem Material relativ leicht gelingt, ist eine Hautinfektion durch Bacillen offenbar nur durch sehr große Bacillendosen zu erreichen. Ein einziges Mal erwies sich noch die cutane Verimpfung von $^1/_{100}$ ccm Milzaufschwemmung als wirksam, sonst nur Dosen bis $^1/_{20}$ Öse. Ja von den 6 einschlägigen Versuchen ist sogar die Hälfte ganz negativ ausgefallen. Die Infektion per os ist, wie bereits oben erläutert wurde, mit *sporenhaltigen* Bacillen bzw. *Sporen* mehrfach gelungen, wenn auch meist nur mit großen Dosen, die Infektion per os mit *sporenfreien* Bacillen war resultatlos.

Während also in bezug auf die natürliche Infektion eintägige Agarkulturen mit beginnender Versporung sich nicht anders verhalten als ältere, sehr sporenreiche Kulturen und auch Sporen verschiedenen Alters nicht deutliche Unterschiede erkennen lassen, wie Tab. 2 zeigt, wirken sporenfreie Milzbrandbacillen *in jeder Hinsicht viel schlechter als sporenhaltige.*

Wie nach früheren Erfahrungen mit natürlicher Infektion von vornherein zu erwarten war, sind die in den vorstehenden Tabellen mitgeteilten Versuche *recht unregelmäßig* ausgefallen.

Diese Tatsache hängt zum Teil sicher mit der verschiedenen Virulenz zusammen, die die einzelnen geprüften Kulturen *bei parenteraler Verimpfung* aufwiesen. Z. B. ist die Wirkung des auf parenteralem Wege am wenigsten virulenten Stammes Y, ebenso diejenige der nicht höchstvirulenten Kulturen des Stammes He im allgemeinen bei cutaner und oraler Verimpfung deutlich geringer als die der Kulturen He von maximaler Virulenz. Nur bei den Versuchen der Tab. 3 tritt — wohl wegen der im ganzen schlechten Wirkung der Bacillen auf den natürlichen Wegen — ein solcher Parallelismus nicht hervor.

Zum Teil können die Unregelmäßigkeiten aber nicht mit einer Verschiedenheit der Virulenz der Kulturen in Zusammenhang gebracht werden.

Für die Hautversuche muß daran gedacht werden, daß möglicherweise das Einreiben der keimhaltigen Flüssigkeit nicht in allen Versuchen und bei allen Tieren gleichmäßig erfolgt ist. Es wird aber auch bei einigermaßen gleichmäßiger Technik mehr oder weniger vom Zufall abhängen, ein wie großer Anteil der aufgebrachten Erreger tatsächlich in die Haut eindringt. Auch bei den Fütterungsversuchen spielt sicher

der Zufall eine Rolle. Bei diesem Tier wird ein großer, bei jenem ein kleinerer Teil der Keime mit der Darmschleimhaut in längere innige Berührung kommen. Um aber die Unregelmäßigkeiten im Infektionserfolg ausschließlich durch derartige Zufälle erklären zu können, dazu sind die Unterschiede doch zu groß. Wir finden bei der *cutanen* Verimpfung einmal noch $^1/_{200\,000}$ Öse wirksam, $^1/_{10}$ und $^1/_{20}$ Öse maximal virulenter Kultur sind aber mehrfach unwirksam. Überhaupt ist die Wirkung großer Dosen, verglichen mit der kleiner Dosen, auffallend gering. Von 42 mit 1 Öse bis $^1/_{20}$ Öse behandelten Mäusen starben 17 = 40%, von 50 mit $^1/_{100}$ bis $^1/_{200\,000}$ Öse behandelten 16 = 32%! Im Versuch 10 gelingt die *orale* Infektion mit einer nicht einmal vollvirulenten Kultur noch regelmäßig mit $^1/_{100}$ Öse, sogar $^1/_{1000}$ Öse tötet eins von 2 Tieren. In allen anderen Fütterungsversuchen gelingt die orale Infektion selbst mit maximal virulenten Erregern nur in Dosen von $^1/_2$—1 Öse.

Aber ein weiteres Argument ist wichtiger: Auch im Erfolg der *pulmonalen* Infektion treten starke Unterschiede hervor, trotzdem die in der Tabelle angegebenen Keimmengen tatsächlich in die Lungen eingedrungen, also offenbar durchweg mit der empfindlichen Schleimhaut in Berührung getreten sind. Rechnen wir die 3 Versuche von *Nowosselesky* mit, so finden wir einmal 20—230 Keime wirksam, in anderen Versuchen mit gleich maximal virulenten Kulturen 4096 bis 16384 Keime bei einigen Tieren unwirksam. Ich möchte deshalb glauben. daß die beobachteten Unterschiede im Infektionserfolg wesentlich durch *Resistenzverschiedenheiten* der Mäuse mit bedingt sind, eine Auffassung, die ja auch *B. Lange* und seine Mitarbeiter ausgesprochen haben.

Daß die höhere oder geringere Empfänglichkeit nicht unter allen Umständen *die verschiedenen Eingangspforten gleichsinnig* betrifft, dafür sprechen die Versuche 4 und 10. In dem Versuch 4 fiel die cutane und orale Infektion bei 10 Mäusen ganz negativ aus, die Inhalationsinfektion hatte aber bei 4 von 6 Mäusen gleichen Körpergewichts Erfolg. Im Versuch 10 infizierte cutan nur 1 Öse, während $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ und $^1/_{1000}$ Öse wirkungslos blieben; in demselben Versuch führten die entsprechenden Dosen, an gleichschwere Tiere *verfüttert*, fast ausnahmslos zur Milzbrandsepsis.

Die *Krankheitsdauer* bei den auf den natürlichen Wegen mit Erfolg infizierten Mäusen unterscheidet sich vielfach nicht von dem Krankheitsverlauf nach parenteraler Infektion mit kleinsten Mengen virulenter Kultur. In mehreren Fällen ist die Krankheit aber deutlich protrahiert, ein Zeichen der Entwicklungshemmung der Keime im tierischen Körper unter der Einwirkung der Abwehrkräfte des Organismus. So finden wir im Versuch 3 (cutan und oral infizierte Tiere) eine Krankheitsdauer von 8—11 Tagen, im Versuch 5 (Inhalationstiere)

eine Dauer von 8—14 Tagen. Derartige protahierte Erkrankungen fand ich bei subcutaner Verimpfung nur, wenn es sich um augenscheinlich abgeschwächt virulente Erreger handelte, eine Erkrankung, die länger als 8 Tage dauerte, habe ich allerdings auch unter diesen Bedingungen nur sehr selten gesehen.

Mehrfach fahndete ich auf *chronische Infektion*; eine große Zahl von Mäusen, die die cutane, orale oder pulmonale Infektion überstanden, habe ich 2—6 Wochen darnach auf latentes Vorkommen von Keimen in der Milz (einige Male auch in Mesenterial- und Cervicaldrüsen) untersucht, stets mit negativem Erfolg. Es scheint also in der Regel dort, wo die Infektion nicht haftet, zu einer restlosen *Abtötung* der Erreger im Mäusekörper zu kommen. Analoge Versuche mit Mäusen, die eine Fütterungsinfektion mit *Mäusetyphus* überstanden hatten, sind bekanntlich vielfach *positiv* ausgefallen [*Webster*, *Topley*, *B. Lange* und *Yoshioka*[1])].

Wichtig ist die Beobachtung, daß unter den percutan mit Erfolg infizierten Tieren ein typisches sulziges Ödem der Subcutis in der Regel nur bei den Mäusen beobachtet wurde, welche mit dem Stamm Km. infiziert waren. Ebensowenig fand sich bei den an Sepsis verendenden Inhalationstieren immer eine makroskopisch sichtbare Veränderung der Lungen. Die Beobachtung zeigt, daß bei der Milzbrandinfektion die *Eingangspforte* selbst nicht immer in hervorstechender Weise zu erkranken braucht.

Mit Rücksicht auf die Beobachtungen von *B. Lange* und *Nowosselesky* an sofort nach der Inhalation getöteten Mäusen verdient noch ein an *meinen* Inhalationstieren erhobener Befund Beachtung. In vier Inhalationsexperimenten mit sporenhaltigem Milzbrand, in denen die sofort getöteten Mäuse auf die Anwesenheit von Keimen in Herzblut und Milz untersucht wurden, konnte häufig ein positives Resultat erhoben werden. Und zwar war im Versuch 3 ein Tier negativ, bei dem zweiten Milz positiv, Herzblut negativ, im Versuch 4 war Milz und Herzblut bei beiden Tieren positiv, im Versuch 5 zweimal Milz, einmal Herzblut, im Versuch 12 einmal Milz positiv. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß *Milzbrandsporen, in die Lungen eingeatmet, häufig sofort ins Blut eindringen; sie verhalten sich in dieser Beziehung gleich den Heubacillensporen und grundsätzlich anders als Mäusetyphus-, Hühnercholerabakterien, Rotlaufbacillen, Streptokokken und Pneumokokken* (*B. Lange* und *Nowosselsky*). In dem Inhalationsversuch mit Milzbrandbacillen konnten die Keime bei zwei sofort getöteten Mäusen in Milz und Herzblut nicht nachgewiesen werden. Auch diese Beobachtung würde, wenn sie sich bestätigt, dafür sprechen, daß in der Regel *nur Sporen* schon sofort nach ihrer Einatmung von den Lungen aus ins Blut übergehen.

[1]) Literatur siehe *Neufeld*. Klin. Wochenschr. 1924, S. 1345.

Der hohe Grad der Empfänglichkeit der Haut für die Milzbrandinfektion wird am deutlichsten durch einen Vergleich mit *der geringen Empfänglichkeit dieses Organes anderen, für die Maus sonst höchst virulenten Septicämieerregern gegenüber.* In Ergänzung der bereits über diesen Gegenstand vorliegenden Erfahrungen habe ich die nachfolgenden Versuche angestellt.

II. Versuche mit Hühnercholera- (Pasteurella-) Bakterien, Mäusetyphus-, Rotlaufbacillen, Streptokokken und Pneumokokken.

Es wurden die gleichen Stämme der Erreger benutzt, mit welchen *B. Lange* gearbeitet hatte. Zur Einreibung in die Haut gelangte 1 Tropfen der betreffenden Kultur in abgestuften Verdünnungen des Ausgangsmaterials. Verfüttert wurden jedesmal 2 Tropfen Kultur. Bezüglich der sonstigen Technik sei auf die Arbeit von *B. Lange* verwiesen. Einzelheiten der Versuchsanordnung und die Ergebnisse sind aus der Tab. 4 ersichtlich.

Wir sehen, daß nur die Infektion mit Mäusetyphus von der Haut aus noch bei Verwendung kleiner, ja kleinster Bakterienmengen gelungen ist. Hier ist allerdings, besonders bei den Spättodesfällen (Versuch 6) an eine komplizierende Fütterungsinfektion zu denken. Leider sind wir deswegen nicht in der Lage, mit Bestimmtheit zu sagen, ob die Bacillen tatsächlich von der Haut aus infiziert haben. Wesentlich anders stellen sich nun die Befunde bei sämtlichen anderen noch geprüften Erregern dar. Selbst bei Verwendung maximal virulenter Kulturen ist mir die Infektion von der Haut aus weder mit Hühnercholerabakterien noch mit Streptokokken und Pneumokokken gelungen. Nur in den beiden Versuchen mit Rotlaufbacillen starb je ein Tier nach Einreibung eines Tropfens unverdünnter Kultur = $^1/_{20}$ ccm. Der Infektionserfolg ist also durchweg schlechter als in den entsprechenden *Lange*schen Versuchen. In diesen Versuchen ist die Infektion mit Rotlauf- und Hühnercholerabacillen von der Haut aus noch mit kleinen, ja bisweilen sehr kleinen Mengen des Erregers gelungen, die Ansteckung mit Pneumo- und Streptokokken zwar nicht mit kleineren, aber doch öfter mit großen Mengen (1 Tropfen unverdünnter Kultur).

Der stärkere Erfolg in den Versuchen *Langes* mag zum Teil damit zusammenhängen, daß hier das Einreiben vielleicht mit etwas stärkerem Druck der Kuppe des Reagensglases erfolgte, die Differenzen meiner und *Langes* Versuchen mit Hühnercholera- und Rotlaufbacillen können aber kaum aus einer abweichenden Technik befriedigend erklärt werden. Möglicherweise sind die damals benutzten Kulturen doch noch virulenter gewesen, wahrscheinlicher ist allerdings, daß für die Verschiedenheit des Infektionserfolges Resistenzverschiedenheiten der geprüften Mäuse wesentlich mit verantwortlich zu machen sind. Vielleicht haben in *Langes* Versuchen kleine Verletzungen durch Bisse oder Flohstiche vorgelegen, die das Eindringen der Keime begünstigt haben, oder es handelt sich

Tabelle 4. *Infektion von Mäusen mit Hühnercholera, Mäusetyphus, Rotlaufbacillen, Strektokokken und Pneumokokken.*

Nr. des Vers.	Art der Erreger	Zahl der Keime pro 1 ccm bzw. 1 Öse Kultur	Kleinste tödliche Dosis in ccm (Inf. ip.)	Erfolg der Infektion: percutan	Erfolg der Infektion: per os
1	Hühnercholera	1 000 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ $\dagger_1$ $^1/_{100\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2 $^1/_{2000}$ ccm 2 : 2; $^1/_{20\,000}$ 2 : 2	$^1/_{20}$ ccm 2 : 1 ($\dagger_4$); $^1/_{200}$ 2 : 2 $^1/_{2000}$ ccm 2 : 1 ($\dagger_{17}$); $^1/_{20\,000}$ 2 : 2
2	"	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_1$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2 $^1/_{2000}$ ccm 2 : 2; $^1/_{20\,000}$ 2 : 2	$^1/_{20}$ ccm 2 : 0 ($\dagger_5$, $\dagger_9$); $^1/_{200}$ 2 : 2 $^1/_{2000}$ ccm 2 : 0 ($\dagger_5$, $\dagger_5$); $^1/_{20\,000}$ 2 : 0 ($\dagger_5$, $\dagger_5$)
3	"	10 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_1$	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{100}$ 2 : 2; $^1/_{1000}$ 2 : 2	.
4	"	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_1$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2 $^1/_{2000}$ ccm 2 : 2; $^1/_{20\,000}$ 2 : 2	$^1/_{2000}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200\,000}$ 2 : 2 $^1/_{2\,000\,000}$ 2 : 2
5	Mäusetyphus	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_6$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ lebt	$^1/_{1000}$ Ö. 6 : 3 ($\dagger_9$, $\dagger_{11}$, $\dagger_{12}$) $^1/_{100\,000}$ Ö. 6 : 1 ($\dagger_9$)	.
6	"	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_7$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_8$, $\dagger_{10}$); $^1/_{200}$ Ö. 2 : 1 ($\dagger_8$) $^1/_{2000}$ Ö. 2 : 2; $^1/_{20\,000}$ Ö. 2 : 0 ($\dagger_{25}$, $\dagger_{38}$)	.
7	Rotlaufbacillen	100 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_4$	$^1/_{20}$ ccm 2 : 1 ($\dagger_2$); $^1/_{200}$ 2 : 2 $^1/_{2000}$ ccm 2 : 2; $^1/_{20\,000}$ 2 : 2	$^1/_{20}$ ccm 4 : 4
8	"	100 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_5$	$^1/_{20}$ ccm 4 : 3 ($\dagger_4$); $^1/_{200}$ 4 : 4 $^1/_{2000}$ 4 : 4	$^1/_{20}$ ccm 4 : 3 ($\dagger_5$); $^1/_{200}$ 4 : 4
9	"	10 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ $\dagger_4$	$^1/_{20}$ ccm 4 : 4; $^1/_{200}$ 4 : 4	.
10	Streptokokken	1 000 000 000	$^1/_{1\,000\,000\,000}$ $\dagger_2$	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2; $^1/_{2000}$ 2 : 2 $^1/_{20\,000}$ 2 : 2	.
11	"	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_2$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2; $^1/_{2000}$ 2 : 2	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2
12	Pneumokokken	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ $\dagger_2$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2; $^1/_{2000}$ 2 : 2	.
13	"	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ $\dagger_2$ $^1/_{10\,000\,000}$ lebt	$^1/_{20}$ ccm 2 : 2; $^1/_{200}$ 2 : 2; $^1/_{2000}$ 2 : 2	$^1/_{20}$ ccm 2 : 0 ($\dagger_4$, $\dagger_6$)

um eine konstitutionell bedingte individuelle oder Rassendisposition. Für die letztere Annahme sprechen einerseits unsere Erfahrungen mit experimenteller Fütterungsinfektion von Mäusen (Mäusetyphus, Hühnercholera, Milzbrand), auch hier konnten auffallend starke Unregelmäßigkeiten des Infektionserfolges beobachtet werden. andererseits die Erfahrung betreffend natürliche Infektionen bei Mensch und Tier (Disposition bestimmter Menschen für Furunculose, edler Schweinerassen für Rotlaufinfektion usw.). Neben einer konstitutionell bedingten Disposition wird auch eine zeitlich begrenzte Disposition, durch verschiedenartige Schädigungen hervorgerufen, in Frage kommen. Es wäre sehr wichtig, auf dem Wege des Tierexperiments einen Einblick zu gewinnen in die Art und Wirkungsweise solcher Schädigungen, die sehr geringfügig sein mögen und wahrscheinlich oft unserer Wahrnehmung entgehen. In dieser Beziehung sind Beobachtungen von Interesse, die *Freund* gelegentlich einer unter Kaninchen und Meerschweinchen im hiesigen Institut ausgebrochenen Stallseuche gemacht hat[1]). Die nachweislich über längere Zeit wirksamen Erkältungsschädigungen hatten die Resistenz der Kaninchen und Meerschweinchen in so starkem Maße herabgesetzt, daß auf den verschiedenen natürlichen Wegen Erreger bei den Tieren zu schwerer tödlicher Sepsis führten, welche bei gesunden Tieren fast ganz ohne Wirkung waren.

Vergleichen wir die Ergebnisse der cutanen mit der Fütterungsinfektion in den Versuchen der Tab. 4, so ist die orale Infektion mehrfach mit einer Kultur erfolgreich, die von der Haut aus nicht zu infizieren vermochte (Versuche 1, 2 und 13). Besonders stark tritt der Unterschied in den Versuchen mit Hühnercholera hervor: $^{1}/_{20}$ ccm von der Haut aus wirkungslos, $^{1}/_{20\,000}$ per os erfolgreich. Nehmen wir die Ergebnisse der Tab. 4 mit den Resultaten der Versuche von *B. Lange* zusammen, so kann geschlossen werden:

Die Empfänglichkeit der Haut ist eine sehr geringe für die Infektion mit Pneumo- und Streptokokken, meist auch für Rotlaufbacillen und Hühnercholerabakterien; bei den beiden letztgenannten Erregern sind aber manchmal noch kleine Mengen wirksam. Die Empfänglichkeit der Haut ist der Empfänglichkeit der Schleimhäute des Verdauungstraktus annähernd gleich gegenüber Streptokokken, Pneumokokken und Rotlaufbacillen. Für Hühnercholerabakterien besteht ein starker Gegensatz zwischen der Empfänglichkeit beider Eingangspforten insofern, als Infektionen per os viel leichter gelingen als von der unverletzten Haut aus.

Die soeben besprochenen Ergebnisse, zusammengehalten mit den Resultaten meiner Milzbrandversuche, lassen nun aufs deutlichste erkennen, daß *die Haut der Maus für die Milzbranderreger eine elektive Empfänglichkeit* besitzt. Denn mit dieser Empfänglichkeit kann die für die anderen Septicämieerreger — ausgenommen vielleicht die Mäusetyphusbacillen — nicht im entferntesten verglichen werden. Der Erfolg der percutanen Infektion mit Mäusetyphus muß aber wohl bei dieser Betrachtung ganz ausscheiden, da eine Beurteilung der ein-

---

[1]) Mitteilung demnächst in dieser Zeitschrift.

schlägigen Versuche wegen der gleichzeitigen Gelegenheit zu der höchst wirksamen Fütterungsinfektion sehr erschwert ist. Die hohe Empfänglichkeit der Haut besteht aber anscheinend *lediglich für Sporen*, sie ist für *Milzbrandbacillen* nicht wesentlich höher als z. B. für Rotlaufbacillen und Pneumokokken.

Die Empfänglichkeit der Haut ist nun bei natürlicher Infektion keineswegs so beträchtlich höher als diejenige eines Organs, das anderen Septicämieerregern gegenüber (Mäusetyphus, Hühnercholera, Rotlaufbacillen) eine elektive Empfänglichkeit besitzt, nämlich *der Lungen.* Ich konnte nicht nur die Beobachtungen von *Buchner, Enderlen* u. a. bestätigen und zeigen, daß die Inhalationsinfektion mit sporenhaltigen Bacillen häufig Erfolg hat, sondern auch mit *Nowosselsky* nachweisen, daß dieser Erfolg zuweilen *mit verhältnismäßig kleinen Sporenmengen* erreicht wird. Es handelt sich dabei nicht etwa, wie von manchen Autoren angenommen wird, um eine Infektion des Nasenrachenraums, vielmehr *um eine primäre aerogene Infektion der Lungen*, denn die *Verfütterung* von Sporen hat, verglichen mit der Inhalation, eine *auffallend geringe Wirkung.* Die Infektion vom Verdauungstraktus aus gelingt gewöhnlich nur mit größeren Mengen von Milzbrandsporen, mit Bacillen augenscheinlich überhaupt nicht. Diese Beobachtung bestätigt die Erfahrungen früherer Autoren.

Auf eine Reihe von Schlußfolgerungen, die sich aus meiner Arbeit ergeben, möchte ich erst gelegentlich der Besprechung meiner Versuche an Meerschweinchen näher eingehen. Hier seien nur noch einmal ganz kurz die wichtigsten Resultate meiner Experimente an Mäusen zusammengefaßt.

Schlußsätze:

1. Die Wirkung der Milzbranderreger auf den natürlichen Wegen geht im allgemeinen *ihrer auf parenteralem Wege nachgewiesenen Virulenz* parallel.

2. Bei der Maus kommt unter den natürlichen Eingangspforten gegenüber Milzbranderregern, ganz im Gegensatz zu den übrigen von mir geprüften Septicämieerregern, *der Haut eine elektive Empfänglichkeit* zu. Bei Einreiben in die unverletzte Haut sind allerdings in erster Linie Sporen wirksam. Bacillen haben auch von der Haut aus eine erheblich geringere Wirkung.

3. Die Infektion gelingt auch *durch Einatmung und durch Verfütterung* von Milzbrandsporen. Während aber die Empfänglichkeit der *Lungen* nach den Inhalationsversuchen eine recht hohe ist und derjenigen der Haut sehr nahe kommt, infizieren vom *Verdauungstraktus* aus häufig nicht einmal sehr große Dosen, kleinere Dosen nur ausnahmsweise.

4. Eine Infektion der Lungen und des Verdauungstraktus mit *Bacillen* ist mir überhaupt nicht gelungen.

5. Die in die Lungen eingeatmeten Sporen *dringen vielfach sofort in das Blut ein.*

6. Die starken Unregelmäßigkeiten im Erfolg meiner Versuche mit percutaner, oraler und pulmonaler Infektion müssen in erster Linie auf individuelle *Resistenzverschiedenheiten* der Tiere zurückgeführt werden.

Literaturverzeichnis.

Adler, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **104**, 250. 1925. — *Besredka*, Ann. de l'inst. Pasteur **35**, 421. 1921. — *Gramatschikoff*, Baumgartens Arbeiten a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. 1891/1892, S. 1450. — *Lange, B.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **102**, 224. 1924. — *Lange, B.* und *Keschischian*, Ebendort **103**, 569. 1924. — *Lange, B.* und *Nowosselsky*, Ebendort **104**, 648. 1925. — *Snel*, Ebendort **40**, 103. 1902. — *Sobernheim* und *Murata*, Ebendort **103**, 691. 1924.

(Aus dem Institut „Robert Koch". — Serologische Abteilung: Geheimrat *Otto.*)

Zur biologischen Differenzierung des Serumeiweißes zoologisch nahestehender Spezies durch den passiv-anaphylaktischen Versuch.

Von

Boris Schwarzmann, Kiew.

Uhlenhuth und *Weidanz* (Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt Bd. 30, S. 434, 1909) hatten darauf hingewiesen, daß sich nach dem Ausfall der Präcipitation und Komplementbindung die zoologisch nahestehenden Tierarten Ratte und Maus biologisch gar nicht so nahestehen, wie z. B. Schaf und Rind. *Trommsdorff* hat diese Frage auf Veranlassung *Uhlenhuths* später weiter verfolgt und dabei gefunden, daß im Meerschweinchenanaphylaxieversuch das Bluteiweiß von Maus und Ratte nicht zu differenzieren war (Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt Bd. 32, S. 560, 1909)[1]).

R. Otto und *E. Cronheim* (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 105, S. 181, 1925), welche auf Grund dieser Befunde die Differenzierungsmöglichkeit im passiv-anaphylaktischen Versuch prüften, konnten zunächst zwar bestätigen, daß beim aktiv-anaphylaktischen Versuch am Meerschweinchen schwerste Reaktionen sowohl nach der Vorbehandlung mit Rattenserum wie nach der Präparierung mit Mäuseserum eintraten, gleichviel ob man Ratten- oder Mäuseserum reinjizierte, es war aber beim quantitativen Austitrieren ein Unterschied erkennbar, insofern als die Dosis letalis minima für das homologe Serum in vielen Fällen, besonders beim Mäuseserum, etwas geringer war[2]). Im passiv-anaphylaktischen

[1]) Bezüglich der Möglichkeit der Unterscheidung verwandter Blutarten sei auf die Darstellung von *Uhlenhuth* und *Weidanz* verwiesen (*Uhlenhuth* und *Weidanz*, Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909, S. 62ff.). Aus ihr ergibt sich, daß gewisse Methoden, besonders das Uhlenhuthsche Serumgewinnungsverfahren (z. B. Vorbehandlung von Affen mit Menschenblut) eine Unterscheidung nahestehender Blutsera gestatten.

[2]) Diese Befunde entsprechen denen von *H. Pfeiffer* (das Problem der Eiweißanaphylaxie. Jena 1910, S. 219), während *Graetz* (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **6**, 627. 1910) durch das Überempfindlichkeitsphänomen eine Differenzierung der Blutarten weiße Maus und Ratte (Mus rattus, decumanus und weiße Ratte) nicht gelang. Auch *Steffenhagen* und *Schoenburg* (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **8**, 563. 1911) haben darauf hingewiesen, daß zwischen Ratte und Maus eine entferntere Verwandtschaft bestehen müsse als zwischen Schaf und Rind, Pferd und Esel usw. (vgl. dazu *Uhlenhuth* und *Haendel*, Ergebn. d. wissenschaftl. Med. 1910).

Versuch gelang ihnen in einem Falle die Differenzierung zwischen Ratten- und Mäusebluteiweiß nach der Präparierung mit einem Antimäuseserum, als die In vitro-Reaktionen versagten.

Da *Otto* und *Cronheim* nur drei Antisera zur Verfügung standen, habe ich auf Veranlassung von Herrn Geheimrat *Otto* die Frage der *Differenzierungsmöglichkeit im passiv-anaphylaktischen Versuch* (im Vergleich zu der Präcipitation und Komplementbindung) weiter verfolgt. Neben zwei Antirattenseren und einem Antimäuseserum standen mir je zwei Antimenschen- und Antiaffen-Kaninchensera zur Verfügung.

Über die *Herstellung der einzelnen Antisera* geben die folgenden Tabellen Aufschluß:

1. Kaninchen 1527.		(Alle Kaninchen hatten ein Gewicht von rund 2000 g)
	8. IV.	1,0 ccm Rattenserum iv.
	15. IV.	1,0 „ „ „
	22. IV.	2,0 „ „ ip.
	30. IV.	4,0 „ „ „
	6. V.	3,0 „ „ „
	15. V.	Probeblutung: Präcipitation 1 : 1000 +; Passive Anaphylaxie 1,5/0,4 † $_{2'}$[1]).
	17. V.	Entblutet.
2. Kaninchen 1528.	4. V.	0,5 ccm Rattenserum iv.
	11. V.	1,0 „ „ „
	18. V.	1,0 „ „ „
	25. V.	Probeblutung: Präcipitation 1 : 2000 +
	26. V.	Entblutet.
3. Kaninchen 1555.	16. V.	2,0 ccm Menschenserum iv.
	23. V.	2,0 „ „ „
	30. V.	2,0 „ „ „
	21. VI.	5,0 „ „ ip.
	5. VII.	4,0 „ „ „
	22. VII.	3,0 „ „ „
	4. VIII.	3,0 „ „ „
	11. VIII.	Probeblutung: Präcipitation 1 : 7000 +
	12. VIII.	Entblutet.
4. Kaninchen 1556.	16. V.	2,0 ccm Menschenserum iv.
	23. V.	2,0 „ „ „
	30. V.	2,0 „ „ „
	21. VI.	5,0 „ „ „
	7. VII.	4,0 „ „ ip.
	22. VII.	3,0 „ „ „
	4. VIII.	3,0 „ „ „
	18. VIII.	5,0 „ „ „
	3. IX.	5,0 „ „ „
	9. IX.	Probeblutung: Präcipitation 1 : 6000 +
	10. IX.	Entblutet.

---

[1]) 1,5/0,4 heißt: Präparierung mit 1,5 ccm Antiserum ip. und 24 Stunden später iv. Injektion von 0,4 ccm homologem Antigen (in diesem Falle Rattenblutserum).

5. Kaninchen 1557. 16. V. 2,0 ccm Affenserum iv.
23. V. 2,0 „ „ „
30. V. 2,0 „ „ „
22. VI. 5,0 „ „ ip.
6. VII. 4,0 „ „ „
13. VII. 3,0 „ „ „
20. VII. Probeblutung: Präcipitation 1 : 1000 +
21. VII. Entblutet.

6. Kaninchen 1558. 16. V. 2,0 ccm Affenserum iv.
23. V. 2,0 „ „ „
30. V. 2,0 „ „ „
9. VI. Probeblutung: Präcipitation 1 : 2000 +
10. VI. Entblutet.

7. Kaninchen 1568.
17. VI. 2,0 ccm Mäuseserum iv. (2 mal je 1,0 ccm mit 1 St. Pause)
26. VI. 2,0 „ „ „ (2 mal je 1,0 ccm mit 1 St. Pause)
2. IX. 3,0 „ „ ip.
8. IX. Probeblutung: Präcipitation 1 : 8000 +
9. IX. Entblutet.

Mit diesen 7 verschiedenen Antiseren wurden einerseits Präcipitations- und Komplemententbindungsversuche angestellt (die Technik war dieselbe wie bei *Otto* und *Cronheim*) und anderseits Meerschweinchen (von 250 g Gewicht) passiv präpariert. Die passiv präparierten Tiere erhielten am nächsten Tage fallende Mengen der verschiedenen Blutsera (Ratte bzw. Maus, Mensch bzw. Affe) intravenös[1]) injiziert.

Die Protokolle der einzelnen Präcipitations- und Komplementbindungsversuche sollen hier nicht näher angeführt werden. Ihr Ergebnis ist aus der Übersichtstabelle (s. S. 117) erkenntlich. Dagegen seien die Resultate, welche bei dem passiv-anaphylaktischen Versuch erhalten wurden, hier im einzelnen wiedergegeben.

Präparierung und Nachbehandlung[2])	Nr. des Meerschweinchens	Rattenserum	Nr. des Meerschweinchens	Mäuseserum
	Austitrierung des Antiratten-Kaninchenserums Nr. 1527.			
1,5/0,4	1630	$\dagger_4'$	•	•
1,0/1,0	•	•	1648	kr. $\dagger_{24}^h$
1,0/1,0	•	•	4657	kr. l.
1,0/0,6	1649	$\dagger_4'$	1647	kr. $\dagger_{24}^h$
1,0/0,4	1650	sch. kr., legt sich, l.	4658	o. B.
	Antiratten-Kaninchenserum Nr. 1528.			
1,0/0,5	345	o. B.	•	•
2,0/1,0	1563	o. B.	•	•
2,0/1,0	1697	o. B.	•	•
2,0/2,0	1698	$\dagger_3'$	4652	sch. kr. $\dagger_{24}^h$
2,0/2,0	•	•	4659	sch. kr. $\dagger_{24}^h$
2,0/1,5	1699	sch. kr., l.	•	•

[1]) Intravenös am Hinterfuß.
[2]) Präparierung mit Antiserum stets ip., Antigen-Injektion stets iv.
$\dagger_4'$ = typ. anaphyl. Tod in 4 Min.; sch. kr. = schwer krank; kr. = krank; l. kr. = leicht krank; l. = lebt; o. B. = ohne Erscheinungen.

Präparierung und Nachbehandlung[1])	Nr. des Meerschweinchens	Homolog. Antig. Menschenserum usw.	Nr. des Meerschweinchens	Heterolog. Antig. Affenserum usw.
		Antimenschen-Kaninchenserum Nr. 1555.		
1,0/0,75	1634	l. kr., l.	·	·
1,5/0,75	141	desgl.	·	·
1,5/1,0	1675	sch. kr., l.	·	·
1,5/1,5	1676	desgl.	·	·
1,5/2,0	1677	$\dagger_{3}'$	4613	sch. kr., l.
1,5/2,0	4616	$\dagger_{3}'$	4615	desgl.
1,5/1,75	·	·	4614	desgl.
2,0/1,0	4664	$\dagger_{5}'$	·	·
		Antimenschen-Kaninchenserum Nr. 1556.		
1,5/0,75	1633	sch. kr., l.	·	·
1,0/1,0	143	desgl.	4639	$\dagger_{5}'$
1,0/1,0	1692	$\dagger_{3}'$	·	·
1,0/0,75	4617	$\dagger_{3}'$	·	·
1,0/0,5	4618	$\dagger_{4}'$	4638	l. kr., l.
1,0/0,2	4620	$\dagger_{3}'$	4637	o. B.
1,0/0,1	4619	kr., legt sich, l.	·	·
		Antiaffen-Kaninchenserum Nr. 1557.		
		Affenserum		Menschenserum
1,5/0,75	1631	kr., legt sich, $\dagger_{1}^{h}$	1632	kr. $\dagger_{1}^{h}$
0,5/0,75	1637	o. B.	·	·
0,5/1,5	1638	l. kr., l.	·	·
1,0/0,75	1635	$\dagger_{3}'$	·	·
1,0/0,5	1639	$\dagger_{3}'$	·	·
1,0/0,25	1640	$\dagger_{3}'30''$	1642	$\dagger_{3}'$
1,0/0,15	1644	$\dagger_{3}'$	1645	$\dagger_{3}'$
1,0/0,1	4621	$\dagger_{3}'$	1643	kr., erholt sich, l.
1,0/0,1	1641	o. B.	·	·
1,0/0,05	4622	$\dagger_{3}'$	4640	$\dagger_{3}'$
1,0/0.035	4651	kr., l.	4642	l.
1,0/0,02	4624	desgl.	4641	l. kr., l.
1,0/0,001	4623	desgl.	·	·
		Antiaffen-Kaninchenserum Nr. 1558.		
2,0/2,0	4665	o. B.	4666	o. B.
2,0/0,5	1566	desgl.	·	·
1,0/1,0	1567	desgl.	·	·
		Antimäuse-Kaninchenserum Nr. 1568.		
		Mäuseserum		Rattenserum
1,0/1,0	4634	$\dagger_{3}'$	4655	$\dagger_{1}^{h}$ [2])
1,0/0,5	4629	kr., l. [2])	4627	$\dagger_{3}'$
1,0/0,5	4648	kr. $\dagger_{24}^{h}$	·	·
1,0/0,25	4631	$\dagger_{4}'$	4628	kr.?, l.
1,0/0,25	4636	$\dagger_{3}'$	·	·
·	4647	$\dagger_{3}'$	·	·
1,0/0,1	4649	o. B.	4656	o. B.

[1]) Siehe Fußnote 2 auf vorhergehender Seite.

[2]) Die Erscheinung, daß größere Antigenmengen hier in paradoxer Weise weniger sicher wirken, erinnert an ähnliche Beobachtungen von *Doerr* und *Berger* bei der Titration des anaphylaktischen Reaktionskörpers.

Übersichtstabelle.

Nr. der Kaninchen	Präcipitation		Komplementbindung		Anaphylaxie	
Anti*ratten*-Kan.-Ser. 1527	**Ratte** 1 : 1000 +	**Maus** 1 : 100 +	**Ratte** 1 : 100 000 ++++/+++	**Maus** 1 : 1 000 ±	**Ratte** 1,0/0,6 $†_4'$ 1,0/0,4 kr. $†_{24}^h$	**Maus** 1,0/0,6 kr. $†_{24}^h$ 1,0/0,4 o. B., l.
Anti*ratten*-Kan.-Ser. 1528	**Ratte** 1 : 2000 +	**Maus** 1 : 100 −	**Ratte** 1 : 100 000 +	**Maus** 1 : 100 ±	**Ratte** 2,0/2,0 $†_3'$ 2,0/1,5 schw. kr.	**Maus** 2,0/2,0 kr. $†_{24}^h$
Anti*menschen*-Kan.-Ser. 1555	**Mensch** 1 : 7000 +	**Affe** 1 : 1000 +	**Mensch** 1 : 10 000 − 1 : 1 000 ++++ (nicht weiter	**Affe** 1 : 10 000 − 1 : 1 000 ++++ austitriert)	**Mensch** 1,5/2,0 $†_3'$ 2,0/1,0 $†_5'$	**Affe** 1,5/2,0 schw. kr. l.
Anti*menschen*-Kan.-Ser. 1556	**Mensch** 1 : 6000 +	**Affe** 1 : 500 +	**Mensch** 1 : 100 000 − 1 : 10 000 ++++	**Affe** 1 : 100 000 − 1 : 10 000 +	**Mensch** 1,0/0,2 $†_3'$ 1,0/0,1 kr. l.	**Affe** 1,0/1,0 $†_5'$ 1,0/0,5 l.
Anti*affen*-Kan.-Serum 1557	**Affe** 1 : 1000 +	**Mensch** 1 : 100 +	**Affe** 1 : 100 000 − 1 : 10 000 +++	**Mensch** 1 : 100 000 − 1 : 10 000 ++/+++	**Affe** 1,0/0,05 $†_3'$ 1,0/0,035 kr. l.	**Mensch** 1,0/0,05 $†_3'$ 1,0/0,035 l.
Anti*affen*-Kan.-Serum 1558	**Affe** 1 : 1000 +	**Mensch** 1 : 1000 +	**Affe** 1 : 100 +++	**Mensch** 1 : 100 +	**Affe** 2,0/2,0 l.	**Mensch** 2,0/2,0 l.
Anti*mäuse*-Kan.-Ser. 1568	**Maus** 1 : 8000 +	**Ratte** 1 : 5000 +	**Maus** 1 : 1 000 000 ++++/+++	**Ratte** 1 : 1 000 000 +	**Maus** 1,0/0,25 $†_3'$ 1,0/0,1 l.	**Ratte** 1,0/1,0 $†_1^h$ 1,0/0,5 $†_3'$ 1,0/0,25 kr. ? l. 1,0/0,1 o. B., l.

Die Resultate der Präcipitations-, Komplementbindungs- und passiv-anaphylaktischen Versuche sind in der Übersichtstabelle nebeneinander gestellt. Es ergibt sich, daß alle Sera mit Ausnahme des Anti-Affenserums 1558 außer Präcipitinen und *Bordet*schen Antikörpern auch anaphylaktische Reaktionskörper enthielten. Dieses Serum 1558 war auch insofern abweichend von den anderen, als es einen verhältnismäßig geringen Gehalt an *Bordet*schen Antikörpern zeigte.

Im einzelnen war:

Durch das Serum	Bei der Präcipitation	Bei der Komplementbindung	Im passiv-anaphylaktischen Versuch
I. Die Differenzierung zwischen Ratten- und Mäusebluteiweiß:			
a) Nr. 1527 (Antirattenserum).	deutlich	sehr deutlich	sehr deutlich
b) Nr. 1528 (Antirattenserum).	sehr deutlich	sehr deutlich	deutlich
c) Nr. 1568 (Antimäuseserum).	wenig deutlich	wenig deutlich	deutlich
II. Differenzierung zwischen Menschen- und Affenbluteiweiß:			
a) Nr. 1555 (Antimenschenser.)	wenig deutl.	kein Unterschied	deutlich
b) Nr. 1556 (Antimenschenser.)	deutlich	wenig deutlich	deutlich
c) Nr. 1557 (Antiaffenserum) .	deutlich	kein Unterschied	kein Unterschied
d) Nr. 1558 (Antiaffenserum .	kein Unterschied	ganz geringer Unterschied	keine Antikörper nachweisbar

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen waren also die folgenden:

Zusammenfassung.

Auch bei meinen Untersuchungen erwies sich der passiv-anaphylaktische Versuch bei einzelnen Antiseren als brauchbar zur Differenzierung des Bluteiweißes zoologisch nahestehender Spezies, selbst in Fällen, wo die In vitro-Reaktionen weniger deutlich ausfielen oder versagten, z. B. beim Antimäuseserum 1568 und bei dem Antimenschenserum 1555.

Anderseits ließen die In vitro-Reaktionen manchmal deutlichere Ausschläge als der passiv-anaphylaktische Versuch erkennen, z. B. beim Antirattenserum 1528, bzw. die Präcipitation allein, z. B. beim Serum 1557 (Antiaffenserum).

Im allgemeinen zeigte sich wiederum kein Parallelismus im Gehalt der Sera an den verschiedenen Antikörpern.

(Aus dem Institut „Robert Koch“. — Serolog. Abt.: Geheimrat *Otto*.)

Das Inkubationsstadium bei der passiv mit homologem Antiserum erzeugten Anaphylaxie.

Von
B. Schwarzmann, Kiew.

Schon in seiner ersten Mitteilung über die passive Anaphylaxie (Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 34) hatte *R. Otto* darauf hingewiesen daß die Auslösung des anaphylaktischen Schocks bei den passiv (heterolog oder homolog) präparierten Tieren nur gelang, wenn das Antiserum *getrennt* von dem Antigen und *vor* diesem injiziert wurde. Daraus hatte er geschlossen, daß zur Erzeugung der Anaphylaxie eine gewisse Verteilung und eine Verankerung der „Antikörper“ an die Körperzellen der Tiere stattgefunden haben muß, ehe deren Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Antigen geändert wird. Die typischen Krankheitserscheinungen waren am deutlichsten, wenn die Präparierung am Tage vorher erfolgt war.

Um das Minimum der Latenzperiode zu ermitteln, injizierten *Doerr* und *Russ* (Lit. — falls nicht besonders angegeben — bei *Doerr, Weichardts* Ergebnisse **1**, 1914 und **5**, 1922) Meerschweinchen Antiserum und Antigen auch intravenös und fanden, daß 4 Stunden verrinnen müssen, bevor eine ausreichende Menge Immunkörper an der richtigen Stelle fixiert ist.

Die weiteren Versuchsergebnisse von *Weil, Coca, v. Fenyvessy* und *Freund* u. a. haben die Anschauung, daß der anaphylaktische Reaktionskörper bei der passiven Anaphylaxie einer bestimmten Zeit zur Verankerung im Körper bedarf, befestigt. Dagegen ist *Friedberger* (auf Grund seiner Versuche mit *Hjelt*, Zeitschr. f. Immunf. **39**, 395, 1924, siehe auch Klin. Wochenschr. 1925, H. 38) zu dem Ergebnis gekommen, daß das sog. „Inkubationsstadium“ bei der passiven Anaphylaxie lediglich auf einer mit der Anaphylaxie nicht in ursächlichem Zusammenhange stehenden Hemmungswirkung (durch das artfremde Antiserum) beruhe. Der Beweis wurde darin erblickt, daß sich auf der Höhe der passiven Präparierung durch Einspritzung von *normalem* Kaninchenserum die Überempfindlichkeit auslöschen ließ. Die Autoren nahmen an, daß das Inkubationsstadium nicht in Erscheinung treten würde, wenn statt artfremden Antiserums artgleiches zur Präparierung gewählt wird.

Verschiedentlich war schon, z. B. auch bei den wichtigen Versuchen von *Dale* am Uterus (Journ. of Pharm. **4**, 167. 1913 und Proc. Roy. Soc. **637**, 126. 1920), die Präparierung mit artgleichem Serum vor-

genommen. Bisher hatten sich jedoch keine Befunde ergeben, welche beim Meerschweinchen einen anaphylaktischen Schock ohne Inkubationszeit erkennen ließen[1]). Kürzlich haben indessen *Friedberger* und *Seidenberg* (Klin. Wochenschr. 1925, S. 1823) berichtet, daß es ihnen durch eine anscheinend besonders günstige Herstellungsart — wenn auch unter enormen Tierverlusten — gelungen sei, von Meerschweinchen ein zwar schwach präcipitierendes, aber passiv hochwirksam anaphylaktisierendes Antiserum zu erhalten.

Wurden normale Meerschweinchen (intravenös) mit diesem Serum vorbehandelt, so trat bei der innerhalb von 5 Minuten darauf mit einer zweiten Spritze (bei noch liegengebliebener Kanüle) vorgenommenen Antigeninjektion ohne jedes Inkubationsstadium die typische Anaphylaxie mit allen Symptomen und dem charakteristischen Obduktionsbild ein. Da sich nach den Erfahrungen unserer Abteilung mühelos passiv sicher anaphylaktisierende Sera von Meerschweinchen gewinnen lassen, so habe ich in der gleichen Weise wie *Friedberger* und *Seidenberg* Versuche angestellt, über die im folgenden kurz berichtet werden soll.

Die benötigten Antisera wurden so gewonnen, daß eine Anzahl Meerschweinchen (6—8) jedesmal mit 0,01 ccm Antigen (Menschen-, Affen-, Pferde- oder Rattenserum) ip. bzw. subcutan vorbehandelt wurden und nach 3 Wochen mit demselben Antigen und zwar beim Rattenserum mit 1,5 ccm bzw. bei den mit Affen- und Pferdeserum präparierten Tieren mit 2 ccm ip. reinjiziert wurden. Diese zweite Dosis war so gewählt, daß keine nennenswerten Verluste durch tödlich endenden anaphylaktischen Schock eintraten. Die überlebenden Tiere wurden 8 Tage darauf entblutet, das Blut aufgefangen und das abgeschiedene Serum aller Tiere derselben Versuchsreihe gemischt. Auf diese Weise erhielt ich folgende 6 Antisera:

Serum I . . .	Antipferdeserum,		Serum IV	Antiaffenserum,
„ II . . .	Antirattenserum,		„ V	Antirattenserum,
„ III . . .	Antimenschenserum.		„ VI	Antiaffenserum.

Die Sera wurden zunächst mit dem entsprechenden Antigen im Präcipationsversuch austitriert und alsdann orientierend auf ihre passiv präparierende Wirkung geprüft. Diese Prüfung wurde in der Weise angestellt, daß Meerschweinchen von 250 g Gewicht 1,5 ccm Antiserum ip. appliziert wurde und ihnen dann am nächsten Tage (nach 20 Stunden) 1,0 ccm Antigen (eine für normale Tiere nicht tödliche Dosis) intravenös injiziert wurde.

Das Resultat des Vorversuches ist aus der folgenden Übersicht erkenntlich:

[1]) Unregelmäßig bei gleichzeitiger Injektion von Antigen und Antikörper (getrennt oder gemischt) auftretende Erscheinungen sahen *Biedl* und *Kraus*, *Doerr* und seine Mitarbeiter (Lit. bei *Doerr*, Handbuch, *Kolle-Wassermann*, **2**, 2).

	Präcipitation		Passiv anaphylaktischer Versuch		
			Meerschweinchen 4692.		
Serum I.	1 : 100	+	1,5 ccm ip.	1,0 ccm iv.	†$_2$′ typischer Befund.
	1 : 1000	—			
			Meerschweinchen 4693.		
Serum II.	1 : 100	—	1,5 ccm ip.	1,0 ccm iv.	0
			Meerschweinchen 4694.		
Serum III.	1 : 100	++	1,5 ccm ip.	1,0 ccm iv.	0
	1 : 1000	+			
	1 : 10 000	—			
			Meerschweinchen 4695.		
Serum IV.	1 : 100	—	1,5 ccm ip.	1,0 ccm iv.	typisch, schwer krank, erholt sich.
			Meerschweinchen 4696.		
Serum V.	1 : 100	—	1,5 ccm ip.	1,0 ccm iv.	†$_2$′ typischer Befund;
			Meerschweinchen 4697.		
Serum VI.	1 : 100	++	1,5 ccm ip.	1,0 ccm iv.	
	1 : 1000	±			
	1 : 10 000	—			†$_2$′ typischer Befund.

Auf Grund des Ausfalles dieser Vorversuche haben wir zu den weiteren Versuchen die Sera I, IV, V und VI ausgewählt.

Wie aus den folgenden Protokollen ersichtlich ist, wurde das Zeitintervall zwischen der Injektion des Antiserums und der nachfolgenden des homologen Antigens in der verschiedensten Weise variiert. Die Injektionen erfolgten in einem Falle unmittelbar hintereinander (in dieselbe Vene), in 4 Versuchen mit 5 Min. Abstand (dabei dreimal mit liegenbleibender Kanüle in dieselbe Vene), in 4 Versuchen mit 15 Min. Abstand (einmal in dieselbe, sonst in verschiedene Venen). In den übrigen Versuchen betrug der Abstand zwischen beiden Injektionen $^1/_2$, 1, $2^1/_2$, 3, 4, 5, 10, 20 bzw. 24 Stunden. Die Injektionen wurden immer in die Vena saphena vorgenommen, und zwar an einem (wenn dieselbe Vene benutzt wurde) oder beiden Hinterfüßen. Das Antiserum wurde in der Dosis von 1,5 bzw. 2,0 ccm injiziert, von dem Antigen immer 1,0 ccm.

Versuch 1. *Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Antipferdeserum I.*

Lfd. Nr.	Meerschw. Nr.	Antiserum-dosis (iv.)	Antigen: n. Pferdeser. Dosis (iv.)	Zeitintervall	Resultat	Bemerkungen
1	4701	1,5 ccm	1,0 ccm	5 Min. (dieselbe Vene)	0	
2	4712	1,5 „	1,0 „	1 Std.	0	
3	4713	1,5 „	1,0 „	4 Std.	unruhig, juckt sich, sonst 0	
4	4692	1,5 „	1,0 „	24 Std.	† 2 Min.	Befund typ.

Versuch 2. *Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Antiaffenserum IV.*

Lfd. Nr.	Meerschw. Nr.	Antiserum-dosis (iv.)	Antigen: n. Affenser. Dosis (iv.)	Zeitintervall	Resultat	Bemerkungen
5	4708	2,0 ccm	1,0 ccm	unmittelbar hintereinand. (in dies. Vene)	0	
6	4707	2,0 „	1,0 „	5 Min. (in dieselbe Vene)	0	
7	4716	2,0 „	1,0 „	desgl.	krank?	
8	4717	1,5 „	1,0 „	15 Min. (in dieselbe Vene)	† 5 Min.	Tod ohne Krämpfe usw., keine Lungenblähung
9	4719	1,5 „	1,0 „	desgl. } (versch.	0	
10	4720	1,5 „	1,0 „	desgl. } Venen)	0	
11	4710	2,0 „	1,0 „	$2^1/_2$ Std.	leicht. Jucken, sonst 0	Temp. 37,9°
12	4718	1,5 „	1,0 „	5 „	Jucken, sonst 0	„ 37,3°
13	4711	1,5 „	1,0 „	24 „	† 3 Min.	typ. Befund
14	4709	2,0 „	1,0 „	24 „	† 3 Min.	desgl.

Versuch 3. *Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Antirattenserum V.*

Lfd. Nr.	Meerschw. Nr.	Antiserum-dosis (iv.)	Antigen: n. Rattens. Dosis (iv.)	Zeitintervall	Resultat	Bemerkungen
15	4702	1,5 ccm	1,0 ccm	5 Min.	fragl. Ersch.	
16	4714	1,5 „	1,0 „	1 Std.	leicht krank	
17	4715	1,5 „	1,0 „	3 „	krank	
18	4696	1,5 „	1,0 „	24 „	† 2 Min.	typ. Befund

Versuch 4. *Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Antiaffenserum VI.*

Lfd. Nr.	Meerschw. Nr.	Antiserum-dosis (iv.)	Antigen: n. Affenser. Dosis (iv.)	Zeitintervall	Resultat
19	4723	1,5 ccm	1,0 ccm	5 Min.	0
20	4724	1,5 „	1,0 „	15 „	0
21	4703	1,5 „	1,0 „	$^1/_2$ Std.	legt sich, leicht krank
22	4725	1,5 „	1,0 „	5 „	juckt sich lebhaft, sonst 0
23	4726	1,5 „	1,0 „	10 „	juckt sich, legt sich; leicht kr.
24	4727	1,5 „	1,0 „	10 „	leicht krank
25	4697	1,5 „	1,0 „	20 „	† 2 Min.

Wie aus den Protokollen hervorgeht, erzielten *wir typischen anaphylaktischen Tod nur, wenn 20 bis 24 Stunden Zeitdifferenz zwischen Präparierung und Antigeninjektion vorhanden waren.* Einmal trat auch ein Todesfall bei 15 Minuten Zwischenraum auf (Meerschweinchen 4717, laufende Nr. 8), doch nicht infolge von Anaphylaxie, sondern anscheinend

infolge Embolie durch Blutgerinnsel. Allerdings zeigten sich bisweilen mehr oder weniger typische Krankheitserscheinungen — wie dies ja aus der Anaphylaxieforschung bekannt ist, auch bei geringerem Zeitintervall; so betrug dieses

beim Meerschw.	4703	(lfd. Nr. 21):	$^1/_2$ Stunde,	leicht krank;
„ „	4714	(„ „ 16):	1 „ ,	leicht krank;
„ „	4710	(„ „ 11):	2$^1/_2$ Stunden,	leichtes Jucken, Temp. 37,9°;
„ „	4715	(„ „ 17):	3 „ ,	krank;
„ „	4713	(„ „ 3):	4 „ ,	unruhig, juckt sich;
„ „	4718	(„ „ 12):	5 „ ,	leichtes Jucken, Temp. 37,3°;
„ „	4725	(„ „ 22):	5 „ ,	lebhaftes Jucken, Temp. 38,0°;
„ „	4726	(„ „ 23):	10 „ ,	leicht krank;
„ „	4727	(„ „ 24):	10 „ ,	leicht krank.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mir in Übereinstimmung mit den früheren Angaben anderer Forscher und im Gegensatz zu den Befunden von *Friedberger* und *Seidenberg* die Erzeugung eines tödlich verlaufenden anaphylaktischen Schocks *ohne* Inkubationszeit nach intravenöser Applikation von Antiserum und Antigen beim Meerschweinchen nicht gelungen ist, obgleich die Präparierung mit homologem Antiserum erfolgte.

Weitere Untersuchungen müssen lehren, wodurch die abweichenden Befunde von *Friedberger* und *Seidenberg* bedingt sind. Denkbar wäre es, daß diese Autoren mit in vivo besonders wirksamen Antiseren gearbeitet haben, und daß es bei der *intravenösen* Injektion solcher Antisera mit dem bald darauf injizierten Antigen zu einer für die Tiere fatal verlaufenden Präcipitation in vivo kommen konnte. Nach mündlicher Mitteilung von Herrn Prof. *Otto* hat er sich lange Zeit (um derartige von vornherein nicht auszuschließende Reaktionen zu vermeiden, vgl. *M. Neisser*, Bakt. Antigene usw. im Handbuch Kraus-Levaditi, Bd. I, S. 18) nur ungern zur intravenösen Präparierung (mit bald nachfolgender intravenöser Antigenapplikation) entschließen können. Auch wenn der homologe Antikörper aus der Zirkulation verschwunden ist, bleiben bekanntlich die passiv präparierten Tiere noch darüber hinaus anaphylaktisch (vgl. *Weils* Befunde).

Nachtrag bei der Korrektur: R. Doerr hat in seinem Referat über Allergie auf dem Kongreß der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft in Dresden (1925) auf die Möglichkeit hingewiesen, daß humorale, in der Blutbahn ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktionen auf die Gefäßendothelien und die glatte Muskulatur zytotoxisch wirken und infolgedessen anaphylaktische Symptome auslösen.

(Aus dem Institut „Robert Koch“. — Abteilung: Prof. *O. Schiemann.*)

Weitere Untersuchungen über die Bedeutung des Reticulo-Endothels für die Immunität.

Von
Dr. **Hans Meyer,**
Assistent am Institut.

Nachdem durch die Forschungen *Ribberts, Goldmans, Aschoffs* und seiner Schule, sowie durch zahlreiche Arbeiten von Physiologen, Pathologen und Klinikern die vielseitige Rolle des Reticulo-Endothels (R.E.) im Stoffwechsel nachgewiesen und die allgemeine Aufmerksamkeit auf diese Zellen gelenkt war, hat man auch ihre Rolle bei der Immunität aufs neue untersucht. Daß ihre wichtigste Funktion, die der Makrophagie, seit *Metschnikoff* bekannt ist, hat *Aschoff* mit Nachdruck hervorgehoben. Während zahlreiche Autoren (*Wyssokowitsch, Werner Rosenthal, Oeller* u. a.) diese Beobachtungen *Metschnikoffs* weiter ausgebaut haben, haben *Bieling* und *Isaac* eine weitere außerordentlich wichtige Funktion der R.E. entdeckt, die von ihrer phagocytären Tätigkeit durchaus unabhängig ist, nämlich ihre Rolle bei der Bildung von Antikörpern: Schalteten sie bei Mäusen durch Entfernung der Milz und Blockade mittels Eisenzucker einen großen Teil des R.E. aus, so war bei den Tieren die Bildung von Agglutininen und Hämolysinen völlig unterdrückt oder doch stark herabgesetzt. Die Autoren gingen von den klassischen Untersuchungen von *Pfeiffer* und *Marx* aus, die nachgewiesen haben, daß die Milz eine wichtige, aber, wie Versuche an entmilzten Kaninchen zeigten, nicht die einzige Bildungsstätte der spezifischen Bakteriolysine ist; *Pfeiffer* nahm hiernach an, daß die spezifischen Antikörper in den blutbereitenden Organen ihren Ursprung haben, die offenbar in weitgehendem Maß einander ersetzen können. Die Befunde von *Bieling* und *Isaac* (1922) bedeuten also eine wichtige Ergänzung und Präzisierung dieser Anschauungen.

Aus der zusammenfassenden Darstellung *Aschoffs* entnehmen wir, daß *Murata*, dessen in Japan erschienene Arbeit auch den anderen deutschen Autoren unbekannt geblieben ist, schon 1918 an Kaninchen analoge Befunde erhoben hat; er fand nach intravenöser Einspritzung

von Olivenöl- oder Lanolinemulsion, Tusche und kolloidalem Silber die Fähigkeit zur Bildung von Hämolysin auf iv. eingeführtes Hammelblut im Vergleich mit Kontrolltieren stets herabgesetzt; er schloß daraus, daß in der Hauptsache die histiocytären Zellen Hämolysin produzieren.

Einige Zeit nach *Bieling* und *Isaac* hat dann *Siegmund* (1922) über positive Ergebnisse bei Kaninchen berichtet; er gibt, allerdings ohne Mitteilung von Protokollen, an, daß Kaninchen nach Entmilzung und Blockade (mit welchen Stoffen wird nicht angegeben) wenig oder gar kein Hämolysin und Agglutinin gegen Bakterien bilden.

Dagegen sahen *F. Rosenthal* und *Fischer* bei Kaninchen nach Entmilzung und sehr hochgradiger, histologisch gesicherter Speicherung mit Eisenzucker nie eine Verminderung, sondern bisweilen eine Steigerung der Hämolysinbildung, und ganz dasselbe fanden *Rosenthal*, *Moses* und *Petzal* für die Bildung von Agglutininen (gegen Typhusbacillen und Blutkörperchen). Auch *Standenath* (1923) sah bei Kaninchen nach Tuscheblockade nicht verminderte, sondern eher vermehrte Bildung von Präcipitinen. Dagegen bewirkte Milzexstirpation bei Kaninchen zuweilen eine wesentliche Herabsetzung der Bildung von Agglutininen (*Russ* und *Kirschner*) und Präcipitinen (*Standenath*). *Rosenthal* und seine Mitarbeiter betonen, daß ihre Ergebnisse denen von *Bieling* und *Isaac* wohl nur scheinbar widersprechen, indem „bei den fließenden Übergängen zwischen Reiz und Lähmung die Stapelung der R.E. beim Kaninchen zu einer Steigerung, bei der Maus zu einer Aufhebung der Funktion dieses Gewebes führen könnte“; es müsse aber „die Frage offen bleiben, inwieweit bei den verschiedenen Tierklassen in verschiedenem Umfange auch andere Gewebskomplexe neben den R.E. an der Antikörperbildung sich beteiligen“.

Neuerdings haben *Gay* und *Clark* (1924) gefunden, daß nach Speicherung mit Trypanblau sowohl bei Kaninchen wie bei Ratten die Bildung von Hämolysin und Bakteriolysin (gegen Choleravibrionen) vollständig oder teilweise gehemmt war, wogegen die Entstehung von Präcipitin (gegen Pferdeserum) zum mindesten nicht regelmäßig beeinflußt wurde.

Diese Befunde deuten vielleicht darauf hin, daß bei den verschiedenen Tierarten die einzelnen Kolloide in verschiedenem Maße geeignet sind, die Antikörperbildung zu hemmen, andererseits aber auch die einzelnen Antikörper sich darin verschieden verhalten; vielleicht werden auch die verschiedenen Antigene vorwiegend von bestimmten Zellen aufgenommen. Man wird dabei aber zunächst wohl an verschiedene Zellgruppen innerhalb desselben Systems denken. *Kraus* und *Schiffmann* (1906) haben auf Grund ihrer vergleichenden Versuche mit Gewebsextrakten und Blutserum nach *Pfeiffers* Vorgang vermutet, daß

die bactericiden Antikörper in Milz, Knochenmark oder Lymphdrüsen, die Präcipitine und Agglutinine dagegen in der Blutbahn, wahrscheinlich in den Endothelien der Gefäße entstehen. Auch *Deutsch* fand die Typhusagglutinine im Gegensatz zu den Lysinen in der Milz immer spärlicher als im Blut und schließt daraus, daß sie an anderer Stelle entstehen, während *Bieling* bei der Maus durch die gleichen Maßnahmen die Entstehung von Agglutininen und Lysinen verhindern konnte. Die Wahrscheinlichkeit spricht wohl dafür, daß sowohl bei den verschiedenen Tierarten als auch den verschiedenen Antigenen gegenüber die Bildung der Antikörper in der Hauptsache in demselben Zellsystem erfolgt. Über die Abgrenzung des Systems der R.E. sind die Pathologen noch nicht ganz einig.

Wir haben nun in einer vorangehenden Arbeit (*Neufeld* und *Meyer*) das Verfahren der Milzexstirpation und Eisenzuckerblockade nach Bielings Vorgang bei Mäusen angewandt, die wir durch ip. Injektionen von abgetöteten Pneumokokken Typ I immunisierten und durch ip. Infektion mit lebenden Erregern auf ihre Immunität prüften; dabei ergab sich, daß durch die genannten Eingriffe, ebenso wie in Bielings Versuchen die Antikörperbildung, so in den unsrigen die Entstehung der aktiven Immunität mehr oder weniger vollständig verhindert wurde. Andererseits ließen sich entmilzte und blockierte Mäuse durch Zufuhr von Antipneumokokken-Serum ohne Schwierigkeit passiv gegen Pneumokokkus I immunisieren; sie vertrugen die ip. Einspritzung großer Mengen hochvirulenter Kultur ohne Schaden und die mikroskopische Beobachtung zeigt, daß die Kokken in der Bauchhöhle durch Phagocyten in derselben Weise, wenn auch vielleicht etwas langsamer, aufgenommen und vernichtet werden wie bei nichtblockierten Tieren, die entweder aktiv oder passiv immunisiert waren. Hieraus schlossen wir, daß das Mißlingen der aktiven Immunisierung bei den entmilzten und blokkierten Mäusen nicht etwa darauf zurückzuführen sei, daß die Tätigkeit der Phagocyten gehemmt ist, deren Mitwirkung bei der spezifischen Immunität gegen Pneumokokken wir, wohl in Übereinstimmung mit allen anderen Untersuchern für absolut unentbehrlich halten — neben zahlreichen anderen Tatsachen sprechen die klaren Ergebnisse *Lippmanns* an aleukocytären Tieren aufs deutlichste in diesem Sinne —, sondern darauf, daß die Antikörperbildung, die wir mit *Bieling* in die R. E. verlegen, unterdrückt ist. Wir sahen hiernach in unseren Ergebnissen eine Stütze für die Anschauung, daß aktive und passive Immunität als wesensgleich anzusehen sind, indem beide auf denselben Antikörpern beruhen, die wir uns zum Teil als frei in den Körpersäften kreisend, zum anderen Teil als zellständig vorstellen; sie bilden den zweiten ebenso unentbehrlichen Faktor der erworbenen Immunität gegen Pneumokokken.

Neben der Frage nach dem Verhältnis zwischen aktiver und passiver Immunität schienen uns unsere Versuche noch auf eine weitere viel erörterte Streitfrage Licht zu werfen, nämlich auf die Frage der sog. örtlichen oder „Gewebs"-immunität. In unseren Versuchen erfolgten sowohl Immunisierung als auch Infektion intraperitoneal; trotzdem blieb der Erfolg aus, wenn die Mäuse nach Entfernung der Milz durch intravenöse Injektion blockiert wurden, es trat also keine örtliche Immunität der Bauchhöhle ein. Wir folgerten daraus, daß die Ausarbeitung der aktiven Immunität ebenso wie die Bildung der spezifischen Antikörper nur in bestimmten Zellen, vielleicht sogar ausschließlich in dem R. E. bzw. allgemein in den Zellen des Gefäßbindegewebsapparates stattfindet.

Wir möchten nun über eine Anzahl neuer Versuche berichten, die wir in Fortsetzung der ersten Arbeit ausgeführt haben und die, wie wir glauben, die soeben dargelegte Auffassung bestätigen.

1. Über das Auftreten von Antikörpern im Blut pneumokokkenimmunisierter Mäuse.

Zunächst wollen wir einen Punkt besprechen, in welchem wir auf Grund unserer weiteren Versuche zu einer anderen Ansicht gekommen sind, als sie in der Arbeit von *Neufeld* und *Meyer* vertreten wurde.

Bekanntlich haben *Walbum* und *Mörch* nach iv. Injektion von Mangan-, Beryllium- und anderen Salzen in bestimmten Dosen bei immunisierten Pferden und Ziegen eine bisweilen sehr erhebliche Steigerung des Antikörpergehaltes des Serums beschrieben. Wir hatten nun geglaubt, bei unseren pneumokokkenimmunisierten Mäusen eine entsprechende Wirkung von Manganinjektionen festzustellen und so gewissermaßen das Freiwerden vorher zellständiger Antikörper unmittelbar beobachten zu können. Bei späterer Fortsetzung der Versuche fanden wir aber auch bei immunisierten Mäusen, die nicht mit Mangan behandelt wurden, reichlich Schutzstoffe im Blut, und als wir die Menge dieser Antistoffe bei einer großen Anzahl von Tieren mit und ohne Manganinjektion quantitativ genauer feststellten, ergaben sich zwar nicht unbeträchtliche Schwankungen, aber kein deutlicher Unterschied zugunsten der mit Mangan behandelten Tiere.

Diese Befunde hat *Neufeld* gelegentlich eines Vortrages (Sitzungsbericht der Berl. Ges. f. Mikrobiologie vom 15. XII. 1924, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref., Bd. 78, Nr. 17/18, S. 429) sogleich mitgeteilt und unsere frühere Veröffentlichung in diesem Punkte richtiggestellt. Bei dem vielfachen Interesse, das die Mitteilungen der Kopenhagener Autoren gefunden haben, sollen aber die einschlägigen Protokolle unserer Versuche nachstehend ausführlich wiedergegeben werden.

Es wurden nach der von *Yoshioka* angegebenen und von *Killian* vervollständigten Methode Mäuse immunisiert mit im Dampftopf bei 100° $^1/_2$ Stunde abgetötetem Pneumokokkenimpfstoff — Typ. I, Stamm Wachholz — in einer Tagesserie von 5 Injektionen ip. mit $^1/_2$stündigen Pausen, und zwar teils mit der Gesamtdosis 0,03 teils 0,003; ein anderer Teil der Tiere wurde nach *Killians* Methode 4 Wochen in 4tägigen Abständen mit einer Impfstoffinjektion ip. pro Tag „hochgetrieben" in schneller Steigerung bis zur Gesamtdosis 1,0 oder 3,0, in einem Falle sogar 8,0. Tab. 1b enthält den Schutztiter von Serum bzw. Schwanzblut nach iv. Manganinjektion, Tab. Ia ohne Mangan. In einem Vorversuch haben wir uns davon überzeugt, daß die quantitativen Unterschiede in der Schutzkraft von Blut und Serum der Mäuse zum mindesten nicht so groß sind, daß sie bei unserer Versuchsanordnung zutage treten; das Schwanzblut der lebenden Tiere besaß praktisch den gleichen Titer wie die nach Tötung derselben Tiere

gewonnenen Sera. Die Zahlen in der Rubrik „Tag der Blutentnahme" bedeuten den jeweiligen Tag nach der letzten Impfstoffinjektion. Das Manganchlorür wurde stets am Tage der Blutentnahme iv. injiziert, und zwar 3—6 Stunden vorher; die Menge betrug 0,2—0,3 einer Verdünnung 1 : 2000 in Aq. dest. pro Maus. Gelegentlich wurde, wie aus den Tabellen ersichtlich, Mischschwanzblut oder Mischserum verwendet, doch stets mindestens die gut meßbare Menge von 0,1 oder 0,2 ccm Blut jedem Tier abgenommen. Das Blut wurde gewonnen durch Entblutung in die eröffnete Brusthöhle bzw. am lebenden Tier aus dem Schwanz direkt in 1-ccm-Pipetten, die zuvor mit 1 proz. Na. citricum-Kochsalzlösung in gleicher Menge wie das gewünschte Blutquantum aufgefüllt wurden, also mit 0,1 oder 0,2 Citrat. Für den Schutzprüfungsversuch wurden in kleinen Röhrchen die Verdünnungen des Serums bzw. Schwanzblutes mit Kochsalzlösung im Volumen von 0,2 ccm angesetzt, die 24 Stunden alte Pneumokokkenkultur, die frisch aus einer Mäusepassage isoliert sich jedesmal an Kontrollmäusen bis mindestens 0,000 000 1 herab als tödlich erwies, im gleichen Volumen von 0,2 ccm in entsprechender Verdünnung hinzugefügt und die Mischung nach höchstens 5 Min. ip. injiziert.

Bei Nr. 6—8 der Tab. 1a bzw. 4—6 der Tab. 1b handelt es sich um die gleichen Tiere, bei denen zunächst Blut aus dem Schwanz entnommen, dann nach einer Erholungspause von 2 Stunden Mangan injiziert und wiederum nach 2 Stunden die 2. Blutentnahme (Tab. 1b, Nr. 4) bzw. die Entblutung (Tab. 1b, Nr. 5 u. 6) vorgenommen wurde. In diesen Versuchen trat nach Injektion von Mangan einmal (Tab. 1b, Nr. 6, Tab. 1a, Nr. 8) anscheinend eine gewisse Steigerung des Antikörpergehalts im Blut ein, in einem anderen Fall dagegen (Tab. 1b, Nr. 5, Tab. 1a, Nr. 7) ein Absinken. Die Unterschiede sind aber nur gering und liegen wohl innerhalb der Fehlergrenzen. Beide Fälle betreffen Tiere im Stadium beginnender Immunität, am 3. bzw. 4. Tag nach der Immunisierung. In einem weiteren Fall wurde bei 2 hochgetriebenen Tieren (Tab. 1a, Nr. 6 bzw. Tab. 1b, Nr. 4), die 38 Tage nach der Vorbehandlung mit Mangan injiziert wurden, vor und nach der Manganeinspritzung Blut entnommen und nach Mischung der jeweiligen Proben von beiden Tieren der Antikörpergehalt untersucht; das Mischblut schützte sowohl vor wie nach der Manganinjektion noch in Menge von 0,025, eine Grenze wurde aber nicht festgestellt.

In weiteren Versuchen, die nicht in die Tabellen aufgenommen sind, haben wir einigen mit 0,03 Impfstoff immunisierten Mäusen 3 Injektionen von Mangan iv. (je eine am 5., 6. und 7. Tag nach der Immunisierung) verabfolgt; während das Schwanzblut bei diesen Tieren vor der ersten Mangangabe und auch noch unmittelbar vor der zweiten in Menge von 0,025 gegen 0,00001 Kultur schützte, war nach der zweiten Manganinjektion das Blut auch in der Dosis von 0,1 unwirksam geworden; es gewann seine Schutzkraft auch am nächsten Tage nicht wieder und blieb unwirksam sowohl unmittelbar vor als nach der dritten Manganinjektion. Hier sind die Antikörper augenscheinlich unter dem Einfluß

der mehrfachen Manganinjektionen verschwunden. Dagegen besaß, wie wir in unserer früheren Arbeit beschrieben haben, bei hochgetriebenen, stark immunisierten Tieren das Serum auch nach 3 maliger Mangan-einspritzung noch hohen Schutzwert. 2 malige Blutentnahme allein, ohne Manganeinspritzung, bewirkte kein Absinken der Antikörper.

In diesen (wenigen) Versuchen haben wir also eine Steigerung der Antikörper nach Manganeinspritzung durch Vergleich der vor- und nachher von demselben Tier entnommenen Blutproben nicht feststellen können. Vergleichen wir aber die übrigen mit 0,03 bzw. 0,003 Impfstoff vorbehandelten Mäuse, also die Versuche 9—17 der Tab. 1a mit den Versuchen 7—14 der Tab. 1b in bezug auf die Schutztiter der Sera, so ergibt sich

In Tab. 1a (ohne Manganbehandlung) sind bei Prüfung mit:

0,1	Blut	geschützt	3	Tiere,	verzögert	tot 2,	mit	den	Kontrollen	tot 0
0,05	,,	,,	5	,,	,,	,, 2,	,,	,,	,,	,, 0
0,025	,,	,,	4	,,	,,	,, 0,	,,	,,	,,	,, 3
0,0125	,,	,,	1	,,	,,	,, 0,	,,	,,	,,	,, 6

In Tabe. 1b (mit Manganbhandlung) sind bei Prüfung mit:

0,1	Blut	geschützt	2	Tiere,	verzögert	tot 0,	mit	den	Kontrollen	tot 0
0,05	,,	,,	4	,,	,,	,, 0,	,,	,,	,,	,, 5
0,025	,,	,,	3	,,	,,	,, 0,	,,	,,	,,	,, 4
0,0125	,,	,,	3	,,	,,	,, 3,	,,	,,	,,	,, 3

Auch aus diesen Versuchen läßt sich ein Einfluß des Mangans nicht herauslesen. Wir haben besonders darauf Wert gelegt, solche Tiere zu untersuchen, die sich im Anstieg (vom 3.—8. Tage) oder im Abstieg der Immunität (18. Tag und später) befanden, da wir hier am ehesten einen niedrigen Gehalt des Blutes an Schutzstoffen erwarteten. Vielleicht würde bei anderer Dosierung des Mangans oder bei Wahl eines anderen Zeitpunkts für die Blutentnahme das Ergebnis anders gewesen sein; die dänischen Forscher betonen ja ausdrücklich, daß sie eine Steigerung der Antikörper nur bei ganz bestimmter Dosierung beobachtet haben. Außerdem beziehen sich ihre Angaben auf andere Tierarten und andere Antikörper; schon deshalb läßt sich natürlich nicht sagen, daß unsere Ergebnisse den ihrigen widersprechen. *Worin wir aber unsere frühere Ansicht berichtigen müssen, ist, daß die Annahme, die Maus beherberge nach aktiver Immunisierung mit Pneumokokken in der Regel keine frei zirkulierenden Antikörper, nicht zutrifft.*

Während also Schutzstoffe im Blut unserer immunisierten Mäuse fast regelmäßig vorhanden sind, scheinen Agglutinine nur ausnahmsweise aufzutreten. Unter den Mäusen Nr. 1—5 der Tab. 1a und Nr. 1—3 der Tab. 1b, also lauter hochgetriebenen Tieren, ergab sich nur einmal bei Tier Nr. 1 der Tab. 1b, einem mit Mangan behandelten Tier, Agglutination bis 1 : 20, während in allen übrigen Fällen die Agglutination 1 : 5 negativ war.

Tabelle 1 a. *Prüfung des Antikörpergehaltes des Blutes bzw. Serums von mit Pneumokokkus I immunisierten Mäusen.*

Versuchs-Nr.	Immunisierung ip.	Gesamtdosis in ccm	Tag der Blutentnahme	Geprüft wurde	Dosis der Prüfungskultur	Menge des geprüften Serums bzw. Schwanzblutes						
						0,1	0,05	0,025	0,0125	0,006	0,003	0,0015
1	7 Injektionen in 4 Wochen	3,0	5. Tag	Serum	0,000 01	lebt	·	·	·	·	·	·
2	desgl.	8,0	5. „	„	0,000 001	lebt	·	·	·	·	·	·
3	„	3,0	7. „	„	0,000 01	$\dagger_4$	·	·	·	·	·	·
4	„	1,0	8. „	„	0,000 01	·	lebt	lebt	lebt	lebt	$\dagger_3$	lebt
5	„	3,0	18. „	„	0,000 001	lebt	lebt	·	·	·	·	·
6	„	1,0	38. „	Schwanzblut (2 Tiere)	0,000 001	lebt, lebt	lebt, lebt lebt	lebt, lebt lebt	·	·	·	·
7	5 Injektionen an 1 Tag	0,03	3. „	Schwanzblut	0,000 001	lebt	$\dagger_3$	·	$\dagger_2$	·	·	·
8	desgl.	0,03	4. „	„	0,000 001	lebt	$\dagger_2$	·	$\dagger_2$	·	·	·
9	„	0,03	4. „	Serum	0,000 01	·	lebt	lebt	$\dagger_2$	·	·	·
10	„	0,03	4. „	Schwanzblut (2 Tiere)	0,000 01	·	$\dagger_3$	$\dagger_2$	$\dagger_2$	·	·	·
11	„	0,03	5. „	Serum	0,000 01	$\dagger_4$	·	·	·	·	·	·
12	„	0,03	7. „	„	0,000 001	$\dagger_3$	·	·	·	·	·	·
13	„	0,03	8. „	„	0,000 001	lebt	lebt	lebt	lebt	·	·	·
14	„	0,03	20. „	„	0,000 001	lebt, lebt	$\dagger_2$	·	·	·	·	·
15	„	0,003	4. „	Schwanzblut (3 Tiere)	0,000 01	·	lebt	$\dagger_2$	$\dagger_2$	·	·	·
16	„	0,003	6. „	Schwanzblut (2 Tiere)	0,000 01	·	lebt	lebt	$\dagger_2$	$\dagger_2$	·	·
17	„	0,003	6 „	Serum (2 Tiere)	0,000 01	·	$\dagger_3$ lebt	$\dagger_2$ lebt	$\dagger_2$ $\dagger_2$	$\dagger_2$ $\dagger_2$	·	·

Tabelle 1 b. *Prüfung des Antikörpergehaltes bei ebenso immunisierten Mäusen nach Manganinjektion.*

Die immunisierten Tiere erhalten 3—6 Stunden vor der Blutentnahme 0,2—0,3 ccm einer Lösung 1 : 2000 von Manganchlorür intravenös.

Versuchs-Nr.	Immunisierung ip.	Gesamtdosis in ccm	Tag der Blutentnahme	Geprüft wurde	Dosis der Prüfungskultur	Menge des geprüften Serums bzw. Schwanzblutes							
						0,1	0,05	0,025	0,0125	0,006	0,008	0,0015	0,0001
1	7 Injektionen in 4 Wochen	4,0	4. Tag	Serum	0,000 01	lebt	.	.	.	.	.	.	.
2	desgl.	3,0	5. „	„	0,000 01	.	lebt	.	lebt	.	.	lebt	†2
3	„	3,0	18. „	„	0,000 001	lebt	†3	.	†3	.	.	.	.
4	„	1,0	38. „	Schwanzblut (2 Tiere)	0,000 001	.	lebt	lebt	.	.	.	.	.
5	5 Injektionen an 1 Tag	0,03	3. „	Serum	0,000 001	†2	†2	.	†2	.	.	.	.
6	desgl.	0,03	4. „	„	0,000 001	lebt	lebt	†3	.	.	.	.	.
7	„	0,03	4. „	„	0,000 01	.	lebt	lebt	lebt	lebt	.	.	.
8	„	0,03	7. „	„	0,000 001	.	lebt	.	lebt	†2	.	.	.
9	„	0,03	8. „	„	0,000 001	lebt	†2	†2	†2	.	.	.	.
10	„	0,03	9. „	„	0,000 001	.	†2	†2	†2	†2	†2	†2	.
11	„	0,03	20. „	„	0,000 001	lebt	†2	.	†3	.	.	.	.
12	„	0,003	4. „	Schwanzblut (3 Tiere)	0,000 01	.	†2	†2	†3	.	.	.	.
13	„	0,003	6. „	Serum	0,000 01	.	†2	†2	†2	†2	.	.	.
14	„	0,003	6. „	Serum (2 Tiere)	0,000 01	.	lebt, lebt	lebt, lebt	†3 lebt	†2 †2	.	.	.

Humorale Schutzstoffe finden sich aber nicht nur bei Immunmäusen des Typ I. Unter 11 mit Pneumokokken Typ II (bis 3,0 ccm) hochgetriebenen Immunmäusen schützte 0,05 des Schwanzblutes gegen 0,00001 maximal virulenter Kultur mit Ausnahme zweier Tiere, deren Blut immerhin den Tod bis zum 4. Tag zu verzögern vermochte. Auch als wir Schwanzmischblut von je 4 und je 3 Mäusen, die mit Streptokokkus Aronson hochgetrieben waren (bis zu 3,0 bzw. 4,0 ccm Impfstoff) prüften, fanden wir beidemal einen Schutzwert von 0,05 Blut gegen 0,00001 und 0,000001 ccm Kultur bei maximaler Virulenz.

Jedenfalls zeigen unsere Versuche, daß beinahe regelmäßig bei Immunisierung nach den von *Yoshioka* und *Killian* erprobten Methoden auch Schutzstoffe im Blut der Mäuse sich einstellen sowohl gegen Pneumokokken Typ I und II, wie gegen Streptokokken, und zwar treten sie gleichzeitig mit der Manifestierung der aktiven Immunität auf.

Die Menge der Antikörper im Blut scheint aber, wofür auch *Cecil* und *Blakes* bekannte Affenversuche sprechen, nicht immer der Höhe der aktiven Immunität parallel zu gehen, so daß also das Verhältnis zwischen dem Grad der Immunität des Organismus und den Antistoffen, die er ins Blut abstößt, nicht nur, wie wohl allgemein angenommen wird, bei verschiedenen Tierarten und gegenüber verschiedenen Antigenen, sondern in gewissen Grenzen auch individuell schwanken würde. Allerdings sind ja unsere Versuche zu anderem Zweck angestellt; daher fehlt in den meisten Fällen die Prüfung der Blutspender mit abgestuften Dosen auf ihre aktive Immunität, so daß zur endgültigen Beantwortung der aufgeworfenen Frage genauere Versuche nötig wären. Wir wissen aber, daß die Einspritzung von 0,03 und 0,003 Impfstoff in der angegebenen Weise mit großer Regelmäßigkeit eine aktive Immunität zur Folge hat — die 35 Mäuse, die in den nachstehenden Tab. 2—8 als Kontrollen in dieser Weise behandelt waren, erwiesen sich bei der Nachprüfung ohne Ausnahme immun —, und unsere „hochgetriebenen" Mäuse vertrugen sonst immer sehr hohe Dosen lebender Kultur. Es ist daher doch recht auffallend, daß selbst unter diesen letzteren, ebenso wie unter den mit 0,03 Impfstoff eintägig behandelten sich je ein Tier fand (Tab. 1a, Nr. 3 u. 12), dessen Blut, am 7. Tage nach der Immunisierung, also zur günstigsten Zeit entnommen, selbst in der Menge von 0,1 nicht schützte; in der Dosis 0,05 versagte der Schutz häufig, während gelegentlich noch 0,006, in 2 Fällen (bei hochgetriebenen Tieren) auch 0,0015 schützte. *Im Durchschnitt* hatten die letzteren augenscheinlich mehr Schutzstoffe im Blut und es ist wohl kaum zu bezweifeln, daß im allgemeinen mit der Höhe der aktiven Immunität auch die Menge der freien Antikörper zunehmen wird.

2. *Weitere Versuche über den Einfluß der Blockade und Milzexstirpation auf die Entstehung der aktiven Immunität gegen Pneumokokken.*

In den nachfolgenden Versuchen verwendeten wir zunächst wieder Eisenzucker, den wir teilweise (Versuch Tab. 2) nach dem Vorgang von *Rosenthal* und *Spitzer* in der hohen Konzentration von 50 proz. Lösung benutzten — allerdings unter Einbuße von 12 Mäusen von 17, wogegen in einem späteren Versuch (Tab. 8) infolge weit geringerer Toxizität des betreffenden Eisenzuckerpräparates die 50 proz. Lösung ohne Verluste vertragen wurde. Ferner benutzten wir andere elektronegative, lokal- vor allem aber auch allgemein-vitalgespeicherte Kolloide, und zwar außer Tusche die sauren Farbstoffe Trypanblau, Lithioncarmin, Kongorot und das basische Neutralrot.

Zum Vergleich mit dem biologischen Verhalten der Präparate wurden Diffusionsversuche in Gelatine angestellt, teils nach der von *Schulemann* angegebenen Methode, teils nach der von *v. Möllendorff*, wobei wir die positiven Ergebnisse dieser Autoren bezüglich Trypanblau usw. bestätigen, und beim Eisenzucker keine Diffusion feststellen konnten. Betreffs der Dosis tolerata im Tierversuch können wir die Angaben der früheren Autoren bestätigen; sie unterliegt erheblichen Schwankungen für jedes neue und jedes gealterte Präparat; dies gilt ganz besonders für Eisenzucker (darunter Präparate, von denen 0,5—0,6 ccm einer frisch von uns unmittelbar vor dem Tierversuch bereiteten 5 proz. Lösung in Aq. dest. für die Maus tödlich wirkten, andere wiederum in jeglicher Konzentration bis zu 50% in Mengen von 0,3 ccm gut vertragen wurden). Wir haben uns an die Forderung von *Pfeiffer* und *Standenath* gehalten, d. h. stets unmittelbar vor dem Hauptversuch eine Toxizitätsprüfung der frisch hergestellten Eisenzuckerlösung an Mäusen vorgenommen, da nach diesen Verfassern alle übrigen Verfahren physikalischer und chemischer Natur sowohl zur Prüfung als auch zur Herstellung einer nur einigermaßen gleichmäßigen kolloidalen Lösung des Eisenzuckers versagen. In gleicher Weise haben wir auch alle übrigen von uns zur Blockade verwendeten Substanzen geprüft und ihre Lösungen stets unmittelbar vor der Injektion frisch hergestellt, da bekanntlich bei kolloidalen Lösungen mit dem Alter der Dispersitätsgrad und das Diffusionsvermögen sich ändern infolge Neigung zu Ausflockung und Gelbildung und damit die Vitalspeicherung unvollständig bzw. negativ wird, außerdem die Gefahr tödlicher Embolien und zunehmender Toxizität hinzukommt.

Wir haben für die Blockade stets Dosen verwandt, die mindestens $^1/_{10}$ ccm weniger betrugen als die Dosis tolerata der jeweiligen frischen Lösung. Erwähnt sei die Beeinträchtigung des wirksamen Blockadeeffektes durch die nicht so ganz selten von uns beobachtete Abfiltrierung des Kolloids in einigen Organen bei ungenügender Speicherung der R. E. in den übrigen, vor allem in Milz und Lunge; immerhin wird dieser Fehler eingeengt bei Tieren, bei denen durch Milzexstirpation vor der Blockade das R. E.-System verkleinert wird. Die Milz wurde stets in Äthernarkose exstirpiert.

Die zur Blockade benutzten kolloidalen Lösungen wurden sämtlich mit Aq. dest. hergestellt und unfiltriert injiziert; die Injektion geschah stets intravenös mit Ausnahme von Kongorot, das bei iv. Anwendung im Vorversuch meist zum Tode führte; ferner eignete sich Neutralrot nicht für wiederholte iv. Injektionen an 2 aufeinander folgenden Tagen; es wurde deshalb nur einmal iv. gegeben und bei der 2. Injektion (am nächsten Tag) ip. oder besser noch subcutan. Auch werden sowohl Kongorot wie Neutralrot bei subcutaner Darreichung länger im

Körper zurückgehalten als bei ip. und iv. Anwendung, was die Speicherung und Blockadewirkung begünstigen dürfte.

Die Immunisierung und Impfstoffbereitung geschah in allen Versuchen nach *Killians* Angaben. Die zur Impfstoffbereitung benutzte Pneumokokkenkultur wurde zur Erhaltung maximaler Virulenz für jeden Versuch frisch durch Mäusepassage gewonnen und im Dampftopf abgetötet. Die Tiere erhielten 0,03 ccm oder 0,003 ccm Impfstoff (immer bezogen auf die Menge der ausgeschleuderten Bouillonkultur) als Gesamtdosis im Volumen von 1,0 ccm ip. an einem Tage, aber verteilt auf 5 Einzelinjektionen zu je 0,2 ccm in $^1/_2$stündigen Intervallen. Die Infektion wurde in allen Versuchen mit einer 24 Stunden alten Kultur von Pneumokokken aus einer Mäusepassage im Volumen von 0,2 ccm ip. vorgenommen. Stets wurden gleichzeitig mit den eigentlichen Versuchstieren Impfstoffkontrollmäuse immunisiert und mit jenen sowie mit Virulenzkontrollmäusen zusammen infiziert; diese letzteren ergaben stets eine hohe und gleichmäßige Virulenz; sie sind in den Tabellen nicht besonders notiert worden.

Tabelle 2. *Immunisierung von Mäusen mit Pneumokokken nach vorhergehender Blockade mit Eisenzucker bzw. Blockade und Milzexstirpation.*

Anzahl d. Tiere	7. IX.	9. IX.	11. IX.	12. IX.	19. IX.	Ergebnis	
4	Milz-exstirpation	Eisenzucker 0,5 ccm 5% iv.	Eisenzucker 0,2 ccm 50% iv.	Immunisierung 0,03 ccm (5 Injekt.) ip.	Infektion 0,00 001	$\dagger_1\dagger_2$ $\dagger_3$ lebt	4:1
1	—	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	$\dagger_2$	1:0
4	—	—	—	"	"	4 leben	4:4

Ergebnis: Alle 4 Impfstoffkontrollen sind immun. Dagegen sind bei Verwendung der hohen Konzentration von Eisenzucker zur zweiten Blockade von 4 entmilzten und blockierten Mäusen 3 nicht immun, desgleichen 1 nur blockierte.

Tabelle 3. *Blockade mit Tusche, Eisenzucker und Manganchlorür.*

Anzahl d. Tiere	25. X.	28. X.	29. X.	30. X.	30. X. 6. Std. später	6. XI.	Ergebnis	
3	Milz-exstir-pation	Tusche 0,3 ccm 1 : 10 iv.	—	Tusche 0,3 ccm 1 : 10 iv.	Immunisierung 0,03 ccm (5 Injekt.) ip.	Infektion 0,00 001	$\dagger_2\dagger_2$ lebt	[illegible]
4	—	desgl.	—	desgl.	desgl.	desgl.	4 leben	[illegible]
1	—	"	Eisenzucker 0,3 ccm 10% iv.	"	"	"	$\dagger_3$	[illegible]
3	—	Manganchlorür 0,2 ccm 1 : 1000 iv.	Manganchlorür 0,2 ccm 1 : 1000 iv.	Manganchlorür 0,2 ccm 1 : 1000 iv.	"	"	3 leben	[illegible]
5	—	—	—	—	"	"	5 leben	[illegible]

Ergebnis: Wiederum sind alle 5 Kontrollmäuse immun, ebenso aber auch alle 3 mit Manganchlorür behandelten und alle 4 mit Tusche 2 mal blockierten; dagegen ist 1 mit Tusche und Eisenzucker blockiertes Tier nicht immun, und ebensowenig 2 von 3 entmilzten und mit Tusche

blockierten Tieren. Demnach leistet Tusche als Blockademittel in Verbindung mit Milzexstirpation annähernd das gleiche wie Eisenzucker. Manganchlorür ließ keine Wirkung erkennen.

Tabelle 4. *Blockade mit Tusche, Trypanblau und Lithionkarmin.*

Anzahl d. Tiere	18. I.	21. I.	22. I.	23. I.	27. I.	Ergebnis	
3	Milz-exstirpat.	—	Tusche 0,2 ccm 1 : 3 iv.	Immunisierung 0,003 ccm (5 Injekt.) ip.	Infektion 0,00 001	$\dagger_2$ lebt lebt	3:2
5	—	—	desgl.	desgl.	desgl.	5 leben	5:5
4	Milz-exstirpat.	—	Trypanblau 0,25 ccm 1% iv.	"	"	$\dagger_2$ $\dagger_2$ $\dagger_2$ lebt	4:1
3	—	—	desgl.	"	"	lebt lebt lebt	3:3
1	Milz-exstirpat.	Lithionkarm. 0,2 ccm 2,5%	Lithionkarmin 0,2 ccm 2,5%	"	"	$\dagger_2$	1:0
4	—	desgl.	desgl.	"	"	lebt lebt lebt lebt	4:4
1	Milz-exstirpat.	—	Lithionkarmin, Trypanblau } Gemisch 1:2 0,3 ccm iv.	"	"	$\dagger_2$	1:0
5	—	—	—	"	"	5 leben	5:5

Ergebnis: In der Absicht, den Blockadeeffekt zu begünstigen, wurde die Immunisierung mit 10fach kleinerer Dosis als bisher vorgenommen. Trotzdem sind auch hier alle 5 Kontrollmäuse immun, ebenso aber auch alle 12 mit den in der Tabelle angegebenen Kolloiden blockierten; in Kombination mit Milzexstirpation sind dagegen auch diese Substanzen von deutlicher Wirkung. Vielleicht waren die Bedingungen für die Blockade in diesem Versuch insofern erschwert, als zwischen Milzexstirpation und Blockade ein 3mal so großer Zeitraum lag, als in unseren übrigen Versuchen und folglich mit vikariierender Zellneubildung zu rechnen ist.

Tabelle 5. *Blockade mit Kongorot und Neutralrot.*

Anzahl d. Tiere	27. VI.	29. VI.	30. VI.	30. VI. 6 Std. später	6. VII.	Ergebnis	
2	Milz-exstirpat.	Kongorot 5% 0,5 ccm ip.	Kongorot 1% 0,3 ccm sc.	Immunisierung 0,003 (5 Inj.) ip.	Infektion 0,00 001	$\dagger_2$ lebt	2:1
3	desgl.	Neutralrot 2,5% 0,2 ccm iv.	Neutralrot 2,5% 0,4 ccm sc.	desgl.	desgl.	$\dagger_2$ $\dagger_3$ lebt	3:1
1	"	Neutralrot 2,5% 0,3 ccm iv.	—	"	"	lebt	1:1
2	"	Neutralrot 2,5% 0,3 ccm iv.	Kongorot 1% 0,4 ccm sc.	"	"	$\dagger_2$ lebt	2:1
4	—	—	—	"	"	4 leben	4:4

Ergebnis: Abermals sind die in gleicher Weise wie im vorhergehenden Versuch immunisierten 4 Kontrollen immun; die hier in Verbindung mit Milzexstirpation z. T. — wie oben begründet — intraperitoneal und subcutan angewandten Blockademittel erweisen sich ebenfalls als gut wirksam mit Ausnahme der nur 1 maligen Injektion von Neutralrot.

Diese Versuche der Tab. 2—5 zeigen, daß eine Reihe im R.E. vitalgespeicherter Kolloide geeignet ist, die Entstehung der aktiven Pneumokokkenimmunität bei Mäusen zu verhindern. Die Ergebnisse sprechen wie unsere früheren dafür, daß das Zustandekommen der aktiven Immunität unterbunden wird, sobald Schädigungen des R.E.-Systems ein gewisses Maß überschreiten.

3. *Über Hemmung der Antikörperbildung durch vorhergehende Blockade.*

Wir haben nun weiterhin die Frage geprüft, ob dieselben Eingriffe — Milzexstirpation und Blockade — auch gleichzeitig das Entstehen von Antikörpern gegen Pneumokokken verhindert, wie das *Bieling* für Agglutinine und Hämolysine nachgewiesen hat; ist das der Fall, so würde das für die von uns vertretene Auffassung sprechen, daß die aktive Immunität auf Antikörpern beruht. Im Gegensatz dazu haben neuerdings *Singer* und *Adler* die Ansicht vertreten, daß beide Vorgänge in keinem Zusammenhang miteinander stehen; die Antikörper, speziell die gegen Pneumokokken gerichteten, seien auch da, wo sie im Blut vorhanden sind, bedeutungslos für die Immunität und die Wirkung der Blockade soll darin bestehen, daß durch Ausschaltung des R.E. die Endothelphagocytose „das Zentrum des Abwehrmechanismus" gelähmt wird.

Im Versuch Tab. 6 gingen wir so vor, daß wir eine Anzahl von Mäusen nach Milzexstirpation mit Eisenzucker bzw. Trypanblau behandelten und in der bisherigen Weise immunisierten, ebenso 6 Impfstoffkontrollmäuse. 7 Tage danach entnahmen wir, wie in dem früheren Versuch (Tab. 1) beschrieben, Blut aus dem Schwanz und injizierten 0,05 ccm davon plus 0,05 Natriumcitrat und 0,1 NaCl-Lösung gemischt mit 0,00001 Pneumokokkenkultur einer anderen Maus ip. Etwa 3 Stunden danach wurde dieselbe Maus, deren Blut in dieser Weise auf seinen Gehalt an Schutzstoffen geprüft worden war, mit 0,00001 der gleichen Kultur ip. infiziert.

Ergebnis: Die 6 Kontrollmäuse waren immun; bei 2 von ihnen wurde das Schwanzblut geprüft und ergab Schutz in der obengenannten Dosis (0,05), sowie in der halben Dosis (0,025). Demgegenüber vermochte Schwanzblut der 16 entmilzten und blockierten Tiere in keinem Fall eine Maus zu retten, nur 3 mal wurde der Tod um 1 Tag, 3 mal um 2—3 Tage verzögert.

Die Prüfung derselben 16 entmilzten und blockierten Mäuse auf aktive Immunität ergab, daß 6 davon die starke Infektion überlebten,

Tabelle 6.

Prüfung der Immunität gegen Pneumokokken und des Antikörpergehaltes des Blutes bei blockierten und danach immunisierten Mäusen.

Zur Prüfung des Antikörpergehaltes des Blutes wurden 3 Stunden vor der Infektion des Tieres 0,05 ccm Schwanzblut entnommen.

Tier-nummer	6. IV.	9. IV.	10. IV.	11. IV.	18. IV.	Ergebnis	18. IV.	Ergebnis
1	Milzexstirpation	Eisenzucker 0,4 ccm 10% iv.	Eisenzucker 0,5 ccm 20%	Immunisierung 0,003 (5 Injekt.) ip.	Schwanzblutprüfung 0,05 Blut gegen 0,00001 Kultur ip.	†$_2$	Infektion der Blutspender 3 Stunden später 0,00001 ip.	lebt
2	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	†$_2$	desgl.	"
3	"	"	"	"	"	†$_2$	"	"
4	"	"	"	"	"	†$_5$	"	"
5	"	"	"	"	"	†$_2$	"	"
6	"	"	"	"	"	†$_4$	"	"
7	"	0,5 ccm 10% iv.	"	"	"	†$_2$	"	†$_2$
8	"	desgl.	"	"	"	†$_5$	"	†$_5$
9	"	"	"	"	"	†$_2$	"	lebt
10	"	"	"	"	"	†$_3$	"	†$_3$
11	"	"	"	"	"	†$_2$	"	†$_2$
12	"	"	"	"	"	†$_2$	"	†$_2$
13	"	Trypanblau 0,3 ccm 1% iv.	Trypanblau 0,3 ccm 1% iv.	"	"	†$_2$	"	†$_3$
14	"	desgl.	—	"	"	†$_3$	"	†$_7$
15	"	Trypanblau 0,2 ccm 1% iv.	—	"	"	†$_2$	"	†$_2$
16	"	desgl.	—	"	"	†$_3$	"	†$_{11}$
17—22	—	—	—	"	0,05 von 1 Kontrolle	lebt	"	6 leben
					0,025 v. 1 Kontrolle	lebt		

weitere 3 mit erheblicher Verzögerung (bis zu 9 Tagen) starben, ferner 3 einen Tag später als die Kontrollen.

Hieraus glauben wir schließen zu dürfen, daß dieselben Eingriffe, die das Zustandekommen der aktiven Immunität beeinträchtigen, gleichzeitig auch das Auftreten von Schutzstoffen im Blut unterbinden; auch hier sehen wir also einen unmittelbaren Zusammenhang von aktiver Immunität und Antikörpern.

Wenn im Versuch 6 der Einfluß der Blockade auf den Antikörpergehalt des Blutes viel deutlicher ausgesprochen ist als auf die aktive Immunität, so liegt das offenbar daran, daß die erstere Probe eine schärfere ist. Bei schwacher Immunität wird eben häufig ein Tropfen Blut nicht genügend Antikörper enthalten, um eine andere Maus gegen 0,00001 Kultur zu schützen, während das Tier, von dem das Blut stammt, die gleiche Infektionsdosis verträgt. Das müßte selbst dann der Fall sein, wenn man annimmt, daß es über keine weiteren Schutzkräfte verfügt, als über die in seinem Gesamtblut vorhandenen Antikörper.

Die Wirkung der Blockade auf die aktive Immunität war in diesem Versuch erheblich schlechter als in den entsprechenden früheren. Dazu muß erwähnt werden, daß dieses Mal die Dosis des Eisenzuckers abweichend von allen übrigen Versuchen nicht $^{1}/_{10}$ ccm geringer als die Dosis tolerata gewählt wurde, sondern irrtümlicherweise weit niedriger; die Dosis tolerata betrug für dieses Präparat 0,2 ccm einer 50proz. Lösung, und trotzdem sehen wir im Versuch eine deutliche Wirkung.

4. *Versuche über die Wirkung der Blockade auf eine schon bestehende Immunität.*

Es ist uns gelungen, mittels Milzexstirpation und Blockade bei schon immunisierten Mäusen in einigen Fällen die Immunität aufzuheben.

Tabelle 7.

Einfluß von Milzexstirpation und Blockade auf die Immunität vorher immunisierter Tiere.

Tier-Anzahl	1. Tag	4. Tag	7. Tag	8. Tag		Ergebnis	
2	Immunisierung 0,03 (5 Inj.) ip.	Milzexstirpation	Eisenzucker 0,4 ccm 5% iv.	Infektion 0,000 01 ip.		$†_3$ lebt	2:1
6	desgl.	—	desgl.	desgl.		$†_2$ 5 leben	6:5
4	„	Milzexstirpation	Eisenzucker 0,3 ccm 20% iv.	„		$†_1$ $†_2$ lebt, lebt	4:2
1	„	—	desgl.	„		$†_2$	1:0
3	„	Milzexstirpation	Tusche 0,25 ccm 10% iv.	Tusche 0,25 ccm 10% iv.	6 Stunden später Inf. 0,000 01 ip.	3 leben	3:3
3	„	—	desgl.	desgl.	desgl.	3 leben	3:3
5	„	—	—	Infektion 0,000 01 ip.		5 leben	5:5

Ergebnis: Alle 5 Kontrollmäuse sind immun, ebenso 3 entmilzte und sogar 2 mal mit Tusche blockierte Mäuse; dagegen waren von 7 mit 5 und 20% Eisenzucker nur blockierten 2 und von 6 ebenso mit Eisenzucker blockierten und entmilzten Mäusen 3 nicht immun. Also ist auch nachträgliche Milzexstirpation und Blockade wirksam, aber offenbar schwächer als vorhergehende.

Bereits von *Singer* und *Adler* sind derartige Versuche mitgeteilt worden. Sie fanden, daß bei gegen Pneumokokken (Typen I, II u. III) immunisierten Kaninchen nach iv. Pneumokokkeninfektion die Kokken schnell und dauernd aus dem Kreislauf verschwinden, während sie bei Normaltieren nach etwa 2 Stunden zwar auch verschwinden, aber nach etwa 6 Stunden wiederkehren, um nun bis zum Tode des Tieres dauernd zuzunehmen. Die betreffenden Kulturen waren für Kaninchen schwach virulent, die Infektionsdosen dementsprechend hoch. Nach Blockade mit Tusche traten nun bei einem Immuntier die Keime vorübergehend wieder im Blut auf, das Tier blieb aber am Leben; die Immunität war also nur herabgesetzt, nicht völlig gebrochen.

5. *Über den Einfluß der nachträglichen Blockade auf die Antikörper des Blutes.*

Der nächste Versuch (Tab. 8) sollte weiterhin den Mechanismus dieser nachträglichen Beeinträchtigung der Immunität klären. *Singer* und *Adler* haben anscheinend als selbstverständlich angenommen, daß die Blockade in ihrem soeben erwähnten Versuch zwar die Immunität aufhebt, aber den Antikörpergehalt des Blutes unbeeinflußt läßt, und sie sehen hierin einen Beweis für die Unabhängigkeit beider Erscheinungen. In einer späteren Arbeit aus dem gleichen Institut hat dann *Bass* einen Versuch mitgeteilt, wonach bei einem mit Streptokokken immunisierten Kaninchen durch nachfolgende Blockade die Immunität herabgesetzt wurde, während der Schutztiter seines Serums (an Mäusen geprüft) der gleiche blieb. Auch hier ist aber der Unterschied zwischen dem Verhalten des blockierten und eines nicht blockierten Immuntieres nicht sehr deutlich; auch das blockierte Immuntier überlebt die iv. Einspritzung von 2 ccm Bouillonkultur (Kontrolltiere starben in 16 Stunden) und die Erreger verschwinden sehr schnell aus dem Blut, nur daß sie im Gegensatz zu dem nicht blockierten Paralleltier vorübergehend nochmals wiederkehren.

Wir haben ebenfalls unsere Tiere außer auf aktive Immunität auch auf den Antikörpergehalt ihres Blutes untersucht.

Tabelle 8. *Einfluß von Milzexstirpation und Blockade auf die Immunität und den Antikörpergehalt vorher immunisierter Mäuse.*

Entnahme von 0,1 Schwanzblut 4 Stunden vor der Infektion der Tiere.

Tiernummer	16. V.	20. V.	25. V.	26. V. Schwanzblutprüfung	Erfolg	26. V. Infektion der Blutspender 4 Std. später	Erfolg
1	Immunisierung 0,003 (5 Inj.) ip.	Milzexstirpation	Eisenzucker 0,3 ccm 50% iv.	0,1 Blut gegen 0,000 01 Kultur	$†_2$	0,000 01	lebt
2	desgl.	"	desgl.	Mischblut 0,1 + 0,000 01	$†_2$	0,000 01	$†_4$
3	"	"	"			0,000 01	lebt
4	"	"	"	0,1 + 0,000 01	lebt	0,000 01	"
5	"	"	"	0,1 + 0,000 01	"	0,000 01	"
6	"	"	"	Mischblut 0,1 + 0,000 01	$†_2$	0,000 01	$†_4$
7	"	"	"			0,000 01	lebt
8	"	—	—	desgl.	lebt	0,000 01	"
9	"	—	—			0,000 01	"
10	"	—	—	"	"	0,000 01	"
11	"	—	—			0,000 01	"
12	"	—	—	"	"	0,000 01	"
13	"	—	—			0,000 01	"

Ergebnis: Alle 6 Impfstoffkontrollen waren immun; von den 7 entmilzten und mit Eisenzucker blockierten Mäusen waren nur 2 nicht immun, auch sie starben aber erst verzögert. Auch hier hat also die nachträgliche Blockade (diesmal mit 50% Eisenzucker) eine verhältnismäßig, d. h. im Vergleich mit vorausgehender Blockade, schwache, aber doch deutliche Wirkung gehabt. Weiterhin sehen wir nun aber, daß bei denselben Tieren auch der Gehalt des Blutes an Schutzstoffen herabgesetzt ist, und zwar, wie in dem Versuch der Tab. 6, noch stärker als ihre aktive Immunität. Das Blut der Kontrollmäuse schützt in jedem Fall, das der blockierten Tiere nur in 2 unter 7 Fällen. *Also auch hier werden durch denselben Eingriff, der die aktive Immunität herabsetzt, auch die Schutzstoffe des Blutes vermindert.*

Was die Erklärung dieser auffallenden Wirkung der Blockade auf die schon fertig gebildeten, im Blut vorhandenen Antikörper betrifft, so scheint uns die Annahme am wahrscheinlichsten, daß es sich dabei im Grunde um denselben Vorgang handelt wie bei der vorausgehenden Blockade, nämlich um eine Störung der Antikörperbildung in den Zellen. Wenn diese innerhalb 24 Stunden ein starkes Absinken der zirkulierenden Antikörper zur Folge haben soll, so muß man allerdings die weitere Annahme machen, daß wenigstens bei Mäusen unter den von uns untersuchten Bedingungen *die Antikörper dauernd reichlich von den Zellen sezerniert und dauernd schnell wieder ausgeschieden oder im Körper vernichtet werden.*

Bereits *Bieling* hat eine ähnliche Beobachtung an Normalantikörpern gemacht und sie ähnlich gedeutet. In Gemeinschaft mit *Isaac* sah er bei entmilzten und gespeicherten Mäusen, denen Hammelblutkörperchen iv. eingespritzt wurden, eine Verzögerung der Hämolyse in vivo (trotz Anwesenheit von Komplement). Sodann stellte er fest, daß bei 2 entmilzten Mäusen 48 Stunden nach Blockierung mit Eisenzucker die sonst regelmäßig vorhandenen Normalhämolysine gegen Hammelblut fehlten; es scheine, daß durch den Eingriff „die Weiterbildung der Normalhämolysine gehemmt wird" (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., Bd. 38, S. 219 u. 223). Die Abgabe von Normalamboceptoren (gegen Kaninchenblutkörperchen) und Normalagglutininen (gegen Coli) haben schon *Hahn* und *v. Skramlik* im Durchströmungsversuch an der überlebenden Hammelmilz nachgewiesen. *Bieling* nimmt ebenso wie wir an, daß die in das Blut gelangten Antikörper schnell zugrunde gehen und dauernd erneuert werden.

Wenn man diese Vorstellung als unwahrscheinlich ablehnt, so bleibt eigentlich nur die Annahme übrig, daß die Blockade unmittelbar, und zwar in äußerst starkem Maß, die fertigen, im Blut kreisenden Antikörper beeinflußt, d. h. zerstört. Hiergegen sprechen aber die im folgenden Abschnitt mitgeteilten Versuche, in denen wir zuerst den Einfluß der vorausgehenden, dann der nachfolgenden Blockade auf die *passive* Immunität untersuchten; dabei ergab sich, daß auch eine intensive Blockade die im Blut vorhandenen Schutzstoffe höchstens im geringen Grade herabsetzt (Tab. 11).

6. *Über die Wirkung der Blockade auf die passive Immunität.*

Schon in unserer ersten Mitteilung haben wir einen Versuch wiedergegeben, wonach bei Mäusen die passive Immunität gegen Pneumokokken durch *vorausgehende* Entmilzung und Blockade nicht beeinträchtigt wird, wenn auch bei mikroskopischer Beobachtung der Ablauf der Phagocytose verlangsamt war im Vergleich mit den Kontrolltieren. Wir haben diesen Versuch zunächst wiederholt und zugleich das Blut der passiv immunisierten Mäuse auf seinen Schutzwert untersucht; dabei haben wir diesmal mit niedrigeren Dosen immunisiert und infiziert in der Absicht, den Blockadeeffekt zu begünstigen. Unter gleichen Bedingungen haben wir sodann Versuche angestellt über die Wirkung *nachträglicher* Blockade und Entmilzung auf zuvor passiv immunisierte Mäuse.

Vorversuche ergaben, daß 0,1 ccm Serum subcutan oder auch intraperitoneal (mit 0,1 ccm NaCl-Lösung) injiziert bei dem von uns benutzten Pferde-Immunserum (amerikanisches Antipneumokokken-Heilserum) eine für unsere Zwecke genügend lange dauernde Immunität hervorrief. Die so immunisierten Mäuse erwiesen sich, am 7. und 8. Tag geprüft, als geschützt gegen Dosen von 0,001 ccm

maximaler virulenter Kultur, während sie der 10 mal stärkeren Infektionsdosis erlagen; auch am 11. Tag waren von 6 mit 0,1 ccm Serum sc. vorbehandelten Mäusen 4 gegen Infektion mit 0,0001 ccm Kultur immun. Da bei nachträglicher Entmilzung und Blockade (Tab. 10, 11, 12) eine größere Zeitspanne zwischen der Immunisierung und der Prüfung liegt, so war es für uns von Wichtigkeit, festzustellen, daß nach den eben mitgeteilten Daten *der durch passive Immunisierung erreichte Grad der Immunität zu der in Frage kommenden Zeit ungefähr dem durch aktive Immunisierung in unseren früheren Versuchen erreichten entspricht.* Auch im Blut dieser passiv immunisierten Tiere waren Schutzstoffe nachzuweisen; 0,05 Schwanzblut, 7 Tage nach der passiven Immunisierung entnommen, schützte gegen 0,0001 ccm Kultur. Bezüglich des Erlöschens der passiven Immunität stellten wir weiterhin fest, daß nach Immunisierung mit 0,4 ccm Serum sc. am 17. Tag nur noch ein unvollkommener Schutz gegen Infektion mit 0,0001 ccm Kultur vorhanden war; die betreffenden 4 Tiere starben um 2—3 Tage verzögert. Überhaupt nicht mehr nachweisbar war ein Schutz am 23. Tage gegenüber einer Infektion mit 0,000 000 1 Kultur. Das bedeutet gegenüber der Dauer der aktiven Immunität ein erheblich rascheres Abklingen. Dabei schützt in dem zitierten Beispiel die von uns gewählte Dosis 0,4 ccm Serum noch nach 48 Stunden gegen eine nachfolgende Infektion mit 0,2 ccm Kultur regelmäßig — ein Grad der Immunität, der in unseren Versuchen bei aktiver Immunisierung mit 0,03 ccm Impfstoff (5 Injektionen an 1 Tag) quantitativ niemals erreicht wird.

Tabelle 9. *Prüfung der Immunität und des Antikörpergehaltes des Blutes von entmilzten und blockierten und darauf passiv immunisierten Tieren.*
Blutentnahme von 0,05 ccm Schwanzblut 2 Stunden vor der Infektion.

Tier-nummer	22. VII.	24. VII.	25. VII.	25. VII. 3 Stunden später Immunisierung	29. VII. Blutentnahme, Prüfung von 0,05 Blut gegen abgestufte Mengen Kultur	Erfolg	29. VII. 2 Stunden nach der Blutentnahme Infektion der Blutspender
1	Milzexstirpation	Eisenzucker 50% 0,3 ccm iv.	Eisenzucker 50% 0,2 ccm iv.	0,001 ccm Serum sc.	0,05 + 0,000 01 ip. 0,05 + 0,000 001 ip.	†₂ lebt	0,0001
2	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	0,05 + 0,000 01 ip. 0,05 + 0,000 001 ip.	†₂ lebt	0,0001
3	„	„	„	„	0,05 + 0,000 01 ip. 0,05 + 0,000 001 ip.	†₂ †₂	0,0001
4	—	—	—	„	0,05 + 0,000 01 ip. 0,05 + 0,000 001 ip.	†₂ lebt	0,0001
5	—	—	—	„	0,05 + 0,000 01 ip. 0,05 + 0,000 001 ip.	†₂ lebt	0,0001

Ergebnis: Trotz 2 maliger Blockade mit 50% Eisenzucker ergab sich keine Aufhebung der Immunität und ebensowenig — bei Prüfung mit abgestuften Dosen — eine Verminderung des Schutzwertes des Blutes (der eine Todesfall bei Tier Nr. 3 ist wohl zufällig).

Der Versuch spricht ebenso wie der in unserer ersten Arbeit mitgeteilte mit passiver Immunität entschieden dagegen, daß unsere Be-

obachtungen in der Weise zu erklären sind, wie es *Singer* und *Adler* für die ihrigen annehmen. Wenn die Blockade, wie diese Autoren annehmen, in der Hauptsache die phagocytäre Tätigkeit der Endothelzellen lähmen und *dadurch* die Immunität brechen würden, so müßte sich diese Wirkung ebenso bei den passiv immunisierten Tieren geltend machen. Erneute mikroskopische Untersuchungen haben uns abermals gelehrt, daß bei zuvor entmilzten und blockierten und danach passiv immunisierten Mäusen die Phagocytose in der Bauchhöhle sich von derjenigen bei Kontrollimmuntieren in nichts unterscheidet, außer daß sie später einsetzt. Tusche- bzw. Trypanblaupartikel und Kokken finden sich nebeneinander in ein und derselben Zelle phagocytiert bei Anwendung der von uns meist gebrauchten einfachen bis zweifachen Blockade, die, wie unsere Versuche zeigen, ausreicht, die aktive Immunität zu durchbrechen.

Für die Frage, die den Gegenstand unserer Untersuchung bildet, würde es gleichgültig sein, wenn die von *Adler* und *Singer* gegebene Erklärung für ihre Versuchsanordnung zutreffen sollte; zweifellos ist ja die von ihnen gewählte iv. Einspritzung, noch dazu mit großen Dosen ganz schwach virulenter Kultur, mehr dazu geeignet, eine Schädigung der Endothelzellen bezüglich ihrer Freßfähigkeit hervortreten zu lassen als unser Verfahren der ip. Infektion. Allerdings sind *Rosenthal* und seine Mitarbeiter zu der Überzeugung gekommen, daß gerade beim Kaninchen „eine wirkliche Blockierung der R.E., d. h. eine Behinderung der phagocytären Eigenschaften, auch bei maximaler Behandlung der Tiere nicht durchführbar ist“.

In den folgenden Versuchen wurde die Milzexstirpation und Blockade einige Tage *nach* passiver Immunisierung vorgenommen. (Tab. 10.)

Ergebnis: Die Tiere zeigen trotz nachträglicher Milzexstirpation und Blockade (durch allerdings nur 1malige Injektion von Eisenzucker, Tusche oder Trypanblau) die gleiche Immunität wie die 4 Serumkontrollen, und ebenso weist das Blut der blockierten Tiere noch deutliche Schutzwirkung auf. Die Kontrollen wurden in diesem Fall nicht auf Blutschutzstoffe untersucht, vielmehr sollten uns die auf S. 141/142 angegebenen Vorversuche als Kontrollen dienen. Jedenfalls lieferten die 12 blockierten Mäuse mit einziger Ausnahme des ip. immunisierten Tieres Nr. 3 7 Tage, nachdem sie 0,1 Immunserum erhalten hatten, ein Blut, das in der Menge von 0,05 normale Mäuse gegen 0,0001 und 0,000 01 Kultur schützte; die Grenzdosis für die Schutzwirkung wurde allerdings nicht festgestellt. Dagegen wurde die Grenzdosis erreicht bei der Prüfung der Tiere selbst. Sowohl die blockierten Tiere als auch die Serumkontrollen erlagen der größeren Infektionsdosis 0,01, wogegen die kleinere Infektionsdosis 0,001 von sämtlichen Tieren unterschiedlos überstanden wurde. *Somit läßt der Versuch einen Einfluß der nach-*

Tabelle 10. *Prüfung der Immunität und des Antikörpergehaltes des Blutes passiv immunisierter Mäuse, die nach der Immunisierung entmilzt und blockiert wurden.*

Entnahme von 0,05 Blut 4 Stunden nach der Blockade.

Tiernummer	28. VI. 1. Tag Passive Immunisierung	30. VI. 3. Tag	4. VII. 7. Tag	4. VII. 7. Tag Schwanzblutentnahme 4 Stunden nach Blockade	Erfolg	5. VII. 8. Tag Infektion der Blutspender mit	Erfolg
1	0,1 Serum sc.	Milzexstirpation	Eisenzucker 50% 0,2 ccm iv.	0,05 Blut + 0,0001 ip.	lebt	0,01	†$_2$
2	desgl.	„	desgl.	0,05 „ + 0,000 01 ip.	„	0,01	†$_2$
3	„	„	Tusche 1:6 0,2 ccm iv.	0,05 „ + 0,0001 ip.	„	0,01	†$_2$
4	„	„	desgl.	0,05 „ + 0,000 01 ip.	„	0,01	†$_2$
5	„	„	Trypanblau 1% 0,2 ccm iv.	0,05 „ + 0,0001 ip.	„	0,01	†$_2$
1	0,1 Serum ip.	„	Eisenzucker 50% 0,2 ccm iv.	0,05 „ + 0,0001 ip.	„	0,001	lebt
2	desgl.	„	desgl.	0,05 „ + 0,000 01 ip.	„	0,001	„
3	„	„	Tusche 1:6 0,2 ccm iv.	0,05 „ + 0,0001 ip.	†$_3$	0,001	„
4	„	„	desgl.	0,05 „ + 0,000 01 ip.	lebt	0,001	„
5	„	„	Trypanblau 1% 0,2 ccm iv.	0,05 „ + 0,0001 ip.	„	0,001	„
6	„	„	desgl.	0,05 „ + 0,000 01 ip.	„	0,001	„
	Kontrollen:						
1	0,1 Serum sc.	—	—	—	—	0,01	†$_2$
2	desgl.	—	—	—	—	0,001	lebt
3	0,1 Serum ip.	—	—	—	—	0,01	†$_2$
4	desgl.	—	—	—	—	0,001	lebt

träglichen Blockade und Entmilzung auf die passive Immunität nicht erkennen.

Wir haben nun versucht, ob bei intensiver Blockade nicht doch eine, wenn auch nur geringfügige Herabsetzung der Immunität eintritt. Von vornherein wäre das eigentlich unmittelbar nach einem so schweren Eingriff und Ausschaltung zahlreicher Freßzellen zu erwarten; hatten wir doch, wie schon erwähnt, bei blockierten und passiv immunisierten Tieren wenigstens eine Verlangsamung der Phagocytose gesehen. Wir haben daher im nächsten Versuch (Tab. 11) 2mal blockiert (wie u. a. im Versuch Tab. 9).

Tabelle 11. *Versuchsanordnung wie Tabelle 10.*
Blutentnahme von 0,1 ccm Schwanzblut 24 Stunden nach der zweiten Blockade und 3 Stunden vor der Infektion.

[Nummer]	28. VIII. Passive Immunisierung ccm	29. VIII.	31. VIII. Eisenzucker	1. IX. Eisenzucker	2. IX. Blutentnahme Prüfung von 0,1 ccm Blut	Erfolg	2. IX. 8 Std. nach Blutentnahme Infektion der Blutspender ccm	Erfolg
1	0,1 Serum sc.	Milzexstirpat.	0,2 ccm 50% iv.	0,2 ccm 50% iv.	0,1 + 0,000 01	$\dagger_2$	0,001	$\dagger_2$
2	desgl.	"	desgl.	desgl.	desgl.	$\dagger_2$	0,0001	$\dagger_2$
3	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,0001	$\dagger_3$
4	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,0001	$\dagger_3$
5	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,0001	$\dagger_4$
6	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,000 01	$\dagger_3$
7	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,000 01	$\dagger_4$
8	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,000 01	$\dagger_6$
9	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,000 01	$\dagger_7$
0	"	"	"	"	"	$\dagger_2$	0,000 01	lebt
	Kontrollen							
1	0,1 Serum sc.	—	—	—	0,1 + 0,0001	$\dagger_2$	0,001	$\dagger_4$
2	desgl.	—	—	—	0,1 + 0,000 01	$\dagger_3$	0,0001	$\dagger_3$
3	"	—	—	—	0,1 + 0,000 01	$\dagger_4$	0,0001	lebt

Ergebnis: Der Versuch zeigt bei 2maliger Blockade und Entmilzung nach der Immunisierung *anscheinend eine gewisse Herabsetzung sowohl der passiven Immunität der Tiere als auch ihrer Schutzstoffe im Blut.* Allerdings ist der Unterschied gegenüber den Kontrollen nur gering. Auch bei diesen ist 0,0001 die Grenzdosis der Infektion, die nur 1 von 2 Tieren übersteht; die blockierten Tiere sterben auf die gleiche Infektionsdosis fast alle verzögert; bei der 10fach kleineren Infektionsdosis sehen wir z. T. starke Verzögerung des Todes (bis 7. Tag), und 1 blockiertes Tier überlebt.

Was den Antikörpergehalt des Blutes betrifft, so ist ebenfalls bei der von uns gewählten Dosis Blut plus Kultur ein gewisser Einfluß der

Blockade erkennbar; es kann wohl kaum Zufall sein, daß beide Kontrollen Nr. 2 und 3 deutliche Verzögerung des Todes zeigen, wogegen keine einzige der 10 blockierten Mäuse ein Blut lieferte, das den Tod zu verzögern vermochte.

Im folgenden Versuch (Tab. 12) haben wir uns bemüht, die Wirkung der nachträglichen Blockade weitgehend zu begünstigen, indem wir die Immunisierungsdosis viel kleiner wählten, um so die unterste Schutzgrenze zu erreichen, und indem wir ferner die 2mal blockierten Tiere bereits 3 Stunden nach der letzten Blockade infizierten, im Gegensatz zu der Infektion nach 24 Stunden in den Versuchen Nr. 10 und 11. Bei derartiger Versuchsanordnung schien uns am ehesten die Möglichkeit gegeben, auch eine geringe Beeinflussung der passiven Immunität durch nachträgliche Blockade mit Entmilzung zu erkennen. Untersucht wurden die Tiere selbst auf Immunität; auf die Prüfung der Schutzstoffe ihres Blutes wurde verzichtet.

Tabelle 12. *Versuchsanordnung wie Tabellen 10 und 11.*

Tiernummer	17. VII. Passive Immunisierung ccm	18. VII.	20. VII. Eisenzucker 50%	21. VII. Eisenzucker 50%	21. VII. 3 Stunden später Infektion	Erfolg
1	0,01 sc.	Milzexstirpat.	0,3 ccm iv.	0,2 ccm iv.	0,0001 ccm Wachholz ip.	lebt
2	0,01 „	„	—	—	0,0001 „ „ „	„
3	0,01 „	„	—	—	0,00001 „ „ „	„
1	0,001 „	„	0,3 ccm iv.	0,2 ccm iv.	0,0001 „ „ „	†1
2	0,001 „	„	desgl.	desgl.	0,0001 „ „ „	†2
3	0,001 „	„	„	„	0,00001 „ „ „	†1
4	0,001 „	„	„	„	0,00001 „ „ „	†1
5	0,001 „	„	—	—	0,0001 „ „ „	lebt
6	0,001 „	„	—	—	0,00001 „ „ „	„
1	0,0001 „	„	—	—	0,0001 „ „ „	†2
2	0,0001 „	„	—	—	0,00001 „ „ „	†2

Ergebnis: Während die kleinste Serumdosis (0,0001) auch die Kontrollen nicht geschützt hat, die größte (0,01) dagegen sowohl die Kontrollen als auch die blockierten Mäuse, zeigten sich bei den mit der mittleren Serumdosis (0,001) vorbehandelten Tieren ein deutlicher Unterschied. Die beiden Kontrollen überlebten; die mit derselben Serumdosis immunisierten und blockierten 4 Mäuse waren im Gegensatz dazu nicht immun, sondern starben sogar bereits bei der 10fach kleineren Infektionsdosis, und zwar auffallenderweise, worauf wir noch zurückkommen, meist schon am 1. Tage. Den Erfolg müssen wir ausschließlich der Blockade zuschreiben, da in diesem Versuch auch sämtliche Kontrollen entmilzt worden waren.

Soweit in den beiden letzten Versuchen durch nachträgliche Blockade eine Herabsetzung der passiven Immunität gelungen ist, kann man doch nur von einer schwachen Wirkung sprechen. Nun haben die vorhin mitgeteilten Versuche an aktiv immunisierten Mäusen ergeben, daß hier die Immunität schwächer beeinflußt wird bei nachträglicher als bei vorhergehender Blockade. Bei den Versuchen an passiv immunisierten Tieren ist es nach unseren Versuchen umgekehrt. Wir brauchen nur die Versuche Nr. 9 und 12 zu vergleichen: In beiden Versuchen wurde die gleiche Immunisierungsdosis (0,001 Serum) und die gleiche Infektionsdosis (0,0001 Kultur) benutzt, auch die Zeit zwischen Immunisierung und Infektion ist die gleiche und ebenso die Dosis des Blockadekolloids; trotzdem sind die Tiere bei vorausgehender Blockade sämtlich immun, bei nachträglicher sämtlich nicht immun.

Daß im Versuch 12 im Gegensatz zu Versuch 9 mit der Milz auch die im Milzblut enthaltenen Antikörper — eine besondere Ansammlung von Antikörpern findet ja nach den Versuchen von *Pfeiffer* und *Marx* u. a. in der Milz passiv immunisierter Tiere nicht statt — entfernt worden sind, kommt nicht in Betracht, da ja, wie eben hervorgehoben wurde, gerade in diesem Versuch auch die Kontrollen entmilzt worden sind. Verschieden ist dagegen in den Versuchen 9 und 12 das Intervall zwischen Blockade und Infektion: es beträgt im letzten Versuch nur 3 Stunden. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß in diesem Fall in der Tat die Ausschaltung bzw. Verminderung der Aktivität einer großen Zahl von Freßzellen oder auch die allgemeine Schädigung durch den starken Eingriff, der dicht an der Grenze des Ertragenen steht, eine Rolle spielt. Hierfür spricht entschieden auch der auffallend schnelle Tod (innerhalb 24 Stunden) bei 3 Mäusen der Tab. 12, was sonst auch bei gar nicht immunisierten Tieren nur ausnahmsweise vorkommt; die Tiere sind augenscheinlich weniger resistent als unvorbehandelte. Daneben scheint aber, wie wir aus dem Versuch Tab. 11 folgern, durch die nachträgliche Blockade (die in diesem Fall 24 Stunden vor der Blutentnahme erfolgte) auch der Antikörpergehalt des Blutes in geringem Grade vermindert zu sein. Ob dabei eine Adsorption seitens des injizierten Kolloids in Frage kommt, müssen wir dahingestellt lassen; in vitro konnten wir eine solche nicht nachweisen. Nun haben aber *Hahn* und *v. Skramlik* gezeigt, daß die überlebende Meerschweinchenleber aus Antikörperlösungen, mit denen man sie durchströmt, die Antikörper, z. B. Typhusagglutinin, an sich reißt und fest verankert, so daß es bei weiterer Durchströmung mit indifferenten Flüssigkeiten an diese nicht abgegeben wird; setzt man der Flüssigkeit aber Typhusbacillen zu, so werden diese z. T. in agglutinierten Haufen in den Capillaren festgehalten, z. T. von den Kupfferschen Zellen reichlich gefressen, wie die Abbildungen im Vergleich mit ebenso mit Bacillen durchströmten, aber nicht mit Agglutinin

vorbehandelten Lebern aufs deutlichste erkennen lassen. Die Bindung von Antikörpern an Endothelzellen bei der passiven Immunisierung ist bekanntlich auch sonst oft in Betracht gezogen worden. Vielleicht handelt es sich in unseren Versuchen um eine Einwirkung der Blockade auf derart fixierte Antikörper.

Wie dem auch sei, jedenfalls ist in dem zuletzt untersuchten Fall die Immunität nicht etwa völlig aufgehoben, sondern nur in verhältnismäßig geringem Grade herabgesetzt und wenn die Blockade der passiven Immunisierung vorausging, konnten wir überhaupt keinen Einfluß feststellen. Bereits in der vorhergehenden Arbeit haben wir einen Versuch mitgeteilt, in dem eine blockierte und dann passiv immunisierte Maus etwa die millionfach tödliche Dosis von Pneumokokken vertrug. Es kann also in den von uns untersuchten Fällen keine Rede davon sein, daß einem blockierten Tier die Antikörper, die es im Blut hat, gar nichts nützen, wie *Singer* und *Adler* auf Grund ihres Kaninchenversuchs annehmen. Wenn es daher bei genügend starker Blockade in der Mehrzahl der Fälle gelingt, die Entstehung einer aktiven Immunität der Mäuse gegen Pneumokokken zu verhindern, so beruht das nicht auf einer Schädigung der Freßzellen oder der sonstigen Abwehrkräfte des normalen Organismus, sondern darauf, daß die Bildung der spezifischen Antikörper gestört wird, auf denen unserer Annahme nach die aktive Immunität ebenso wie die passive beruht.

Die Anschauung läßt in gewissem Sinne Raum für die alte *Metschnikoff*sche Annahme einer Umstimmung der Körperzellen als Grundphänomen der erworbenen Immunität und für die eng damit zusammenhängende Lehre einer örtlichen Gewebs- oder Organimmunität, nur daß wir die Ursache dieser Umstimmung in dem spezifischen Antikörper sehen, den die Zelle enthält und die Umstimmung daher auf die antikörperbereitenden Zellen sowie auf diejenigen, die etwa passiv den Antikörper aufnehmen, beschränken. Auf diese Fragen gedenken wir in einer folgenden Arbeit einzugehen.

Schlußsätze.

1. Schaltet man bei Mäusen durch intravenöse Einspritzungen von reichlich Eisenzucker und Entfernung der Milz einen großen Teil des R.E. aus, so gelingt es, wie in einer vorhergehenden Arbeit mitgeteilt wurde, in der Regel nicht, solche Tiere durch eine sonst sicher wirksame Vorbehandlung gegen Pneumokokken (Typ I) zu immunisieren. Weitere Versuche bestätigten das; dabei genügte zuweilen auch die Einspritzung von Eisenzucker allein ohne Milzentfernung, um die Immunität zu verhindern. Andere Stoffe, die ebenfalls in den R.E. gespeichert werden, wie Tusche, Trypanblau, Lithioncarmin, Kongorot, Neutralrot, wirkten im gleichen Sinne.

2. Wurden Mäuse zuerst (durch ip. Einspritzung abgetöteter Kultur) gegen Pneumokokkus I immunisiert, dann nach Eintritt der Immunität entmilzt und in der angegebenen Weise blockiert, so gelang es in einem Teil der Fälle, die bestehende Immunität zu brechen; die Wirkung der Blockade war aber schwächer wie in den Versuchen, in denen die Tiere zuerst blockiert und dann immunisiert wurden. Auch bei der nachträglichen Blockade ist der Erfolg vermutlich so zu erklären, daß die Neubildung von Antikörpern in den blockierten R.E. sistiert, während die im zirkulierenden Blut vorhandenen Schutzstoffe schnell ausgeschieden oder zerstört werden.

3. Bei der Mehrsahl der gegen Pneumokokkus I immunisierten Mäuse finden sich Schutzstoffe im Blut; die in unserer ersten Mitteilung vertretene Ansicht, daß diese Antistoffe in der Regel erst nach iv. Einspritzung von Mangansalzen auftreten, hat sich in größeren Versuchsreihen nicht bestätigt. Das Serum der mit Mangan behandelten Tiere enthielt im Durchschnitt nicht mehr Schutzstoffe als das ebenso behandelter Kontrolltiere ohne Manganeinspritzung.

Auch die gegen Pneumokokkus II und Streptokokkus Aronson immunisierten Mäuse zeigten meist reichlich Schutzstoffe im Blut.

4. Die Pneumokokkenantikörper des Blutes werden durch die Maßnahmen der Blockade und Entmilzung in demselben Sinne beeinflußt wie die aktive Immunität; auch in dieser Beziehung wirkte eine der Impfung vorausgehende Blockade stärker als eine nachfolgende.

5. Entmilzte und blockierte Mäuse lassen sich passiv sehr gut gegen Pneumokokken immunisieren; wenn also die gleichen Maßnahmen das Auftreten der aktiven Immunität verhindern, so ist das zum mindesten in der Hauptsache nicht auf eine Beeinträchtigung der phagocytären Tätigkeit der R.E. zurückzuführen — denn diese müßte sich ebenso bei der passiven Immunisierung geltend machen — sondern auf eine Hemmung der Antikörperbildung in diesen Zellen.

6. Wurden Mäuse zuerst passiv immunisiert und danach der Blockade und Milzexstirpation unterworfen, so zeigten sie eine geringe Herabsetzung ihres Immunitätszustandes und gleichzeitig eine leichte Verringerung der Antistoffe in ihrem Blut. Die Wirkung der Blockade war jedoch viel weniger ausgesprochen als bei aktiv immunisierten Tieren; sie ist wahrscheinlich so zu erklären, daß der Teil der Antikörper, der sekundär von Endothelzellen gebunden war, von der Blockade betroffen wird. In einem Versuch, wo die Infektion bereits 3 Stunden nach der Blockade erfolgte, war außerdem offenbar auch die allgemeine Resistenz der Tiere herabgesetzt, und zwar wahrscheinlich durch Hemmung der Phagocytose.

7. Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen ebenso wie die der früher mitgeteilten für die Auffassung, daß die aktive ebenso wie die

passive Immunität gegen Pneumokokken auf spezifischen Antikörpern beruht, die teils im Blut kreisen, teils an Zellen gebunden sind.

Literaturverzeichnis.

Aschoff, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 1925. — *Bass*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **43**, 269. — *Bieling* und *Isaac*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 29, S. 1453; Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **25**, **26**, **28**, **35**; *Bieling*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **38**, 193. — *Cecil* und *Blake*, Journ. of exp. med. **31**, 519 u. 657. — *Deutsch*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **28**, 45. — *Gay* und *Clark*, Proc. of the soc. f. exp. biol. a. med. **22**, 1. 1924; ref. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref., **79**, 349. — *Hahn* und *v. Skramlik*, Biochem. Zeitschr. **98**, 120; **112**, 151; **130**, 80; **131**, 315. — *Killian*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 607; **104**, 489. — *Kraus* und *Schiffmann*, Ann. de l'inst. Pasteur 1906, S. 225. — *Lippmann*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **24**, 107. — *v. Möllendorff*, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Lieferung 21. — *Murata*, zit. nach *Aschoff*. — *Neufeld* und *Meyer*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 595. — *Oeller*, Dtsch. med. Wochenschr. 1923, S. 1287. — *Pfeiffer* und *Standenath*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **37**, 184. — *Pfeiffer* und *Marx*, Zeitschr. f. Hyg. **27**, 272. — *Rosenthal, W.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **31**, 372. — *Rosenthal, F.* und *Fischer*, Klin. Wochenschr. 1922, S. 2265. — *Rosenthal, F.*, *Moses* und *Petzal*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 482. — *Rosenthal, F.* und *Spitzer*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **40**, 529. — *Russ* und *Kirschner*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **32**, 113. — *Schulemann*, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **11**, 307; Biochem. Zeitschr. **80**, 1. — *Siegmund*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 52, S. 2566; Verhandl. d. dtsch. pathol. Ges. 1923, S. 114. — *Standenath*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **38**, 19. — *Walbum* und *Mörch*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **43**, 433; Ann. de l'inst. Pasteur 1923, S. 396. — *Wyssokowitsch*, Zeitschr. f. Hyg. **1**, 3. — *Yoshioka*, Zeitschr. f. Hyg. **97**, 386.

(Aus dem Institut „Robert Koch".)

Zur Frage der Impflähmungen und der Erfolge bei verschiedenen Methoden der Tollwutschutzimpfung.

Von

Prof. **E. Boecker**,

Abteilungsleiter am Institut.

In der vorliegenden Abhandlung, die sich an die früheren Jahresberichte und die Arbeiten von *Jos. Koch*[7]) und *Papamarku*[1]) anschließt, werden zunächst die Erfolge der Berliner Wutschutzstation bei verschieden intensiver Behandlung nach der Methode von *Pasteur* mitgeteilt (Abschnitt I) und die dabei vorgekommenen Fälle von Lähmungen und sonstigen Störungen besprochen (II). Aus unten zu besprechenden Gründen wurde im November 1923 eine neue, auf dem Prinzip der Högyesschen Methode beruhende Behandlungsart eingeführt. Abschnitt III behandelt die Grundlagen und die Ausführung dieser Methode, IV die bei ihrer Anwendung erzielten Erfolge und Abschnitt V die dabei vorgekommenen Fälle von Impflähmung. Abschnitt VI befaßt sich mit der Entstehungsweise dieser viel erörterten Zufälle. In Abschnitt VII sind die Ergebnisse dieser Arbeit kurz zusammengefaßt. In einem Anhang wird über unsere Erfahrungen mit einer versuchsweise eingeführten teilweisen Dezentralisierung der Wutschutzbehandlung berichtet.

Die Mehrzahl der nachfolgend mitgeteilten Beobachtungen wurde während meiner Tätigkeit als Assistent an der Wutschutzabteilung gesammelt.

I. Über die Erfolge der Wutschutzbehandlung nach Pasteur.

In der Berliner Wutschutzstation ist seit ihrer Einrichtung im Jahre 1898 bis zum Herbst 1923 ausschließlich nach der Methode von *Pasteur* behandelt worden. Die Intensität der Behandlung hat jedoch mehrfach gewechselt. In großen Zügen betrachtet, lassen sich 3 Perioden verschieden intensiver Behandlung unterscheiden. Von 1898 bis 1904/05 wurde nach relativ schwachen Schemata behandelt, bei denen höchstens 2tägiges Mark zur Anwendung gelangte, dann kam eine Periode sehr intensiver Behandlung, meist nach Schema Ia und Ib,

Tabelle 1. *Übersicht über die im Institut „Robert Koch“ von 1914—1923 angewandten Schemata der Wutschutzbehandlung nach Pasteur.*

Jahr	Schema	Tag der Behandlung																				
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.
		Alter des Markes																				
1914—1916	I a	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	1
1916—1917	I b	4	3	2	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	1
1915—1916	II a	3	2	3	2	3	2	2	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	1
1915—1916	II b	4	3	2	4	3	2	2	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	1
1916—1923	II c	5	4	3	2	4	3	2	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	1
1916—1923	II d	5	4	3	2	5	4	3	2	5	4	3	2	3	2	1	1	3	2	1	1	1
1916—1923	III	5	4	3	5	4	3	5	4	3	5	4	3	5	4	3	5	4	3	5	4	3

die bis 1916/17 währte. (Bezüglich der Behandlungsschemata sei auf Tab. 1 verwiesen.) Wie bereits von *Papamarku*[1]) mitgeteilt wurde, gab das relativ häufige Auftreten von Impflähmungen bei dieser intensiven Methode Veranlassung, die Behandlung wieder etwas abzuschwächen, indem die Patienten nunmehr seit 1915 zum Teil nach den schwächeren Schemata der Gruppe II und seit 1917 sämtlich je nach dem mutmaßlichen Grade ihrer Gefährdung durch die Bißverletzung nach den Schemata IIc, IId oder III behandelt wurden. Diese Behandlungsart ist bis zum November 1923 beibehalten worden.

Als die zunehmende Zahl unserer Patienten in den Nachkriegsjahren zu immer größerem Bedarf an Impfstoff führte, gingen wir dazu über, auch die Gehirne der Passagekaninchen auszunutzen. Sie wurden zu Streifen von etwa der Dicke des Rückenmarks zerschnitten und wie dieses getrocknet und verarbeitet. Nun enthält das Passagegehirn nach den Feststellungen von *Phillips*[2]) u. a. mehr Virus als das Rückenmark; auch *Hempt*[17]) ist dieser Ansicht. Die Patienten der Nachkriegsjahre sind daher zu einem Teil intensiver behandelt worden als bei den gleichen Schemata (IIc, IId, III) während der Kriegsjahre.

Über die Behandlungserfolge in den 3 besprochenen Perioden gibt die Tab. 2 Auskunft.

Tabelle 2. *Übersicht über die in der Berliner Wutschutzabteilung von 1898 bis November 1923 nach verschiedenen Schemata der Pasteurschen Methode Behandelten.*

Zeitraum	Schemata	Behandelte	Davon Klasse A + B	Todesfälle an Lyssa	
				sämtliche	später als 14 Tg. nach Abschluß d. Behandlung
1898—1904	Durchweg schwache Behandlung (meist 8—2tägiges Mark)	2 253	86%	21 = 0,93%	12 = 0,53%
1905—1917	Meist Ia und Ib (seit 1915 teilweise auch IIc, IId, III) . .	4 191	71%	28 = 0,67%	14 = 0,33%
1917—1923	IIc, IId, III . .	4 399	71%	20 = 0,45%	6 = 0,14%
zus. 1898—1923		10 843		69 = 0,64%	33 = 0,3%

Der 2 malige Wechsel in der Behandlung gestattet uns, an Hand eines beträchtlichen Materials zu der Frage Stellung zu nehmen, inwieweit die Erfolge bei der Behandlung nach *Pasteur* sich mit zunehmender Intensität der Behandlung günstiger gestalten. Nach *Papamarku* ließen die ihm vorliegenden Zahlen der Berliner Station eine deutliche Überlegenheit der intensiveren Behandlung nicht erkennen. Im Institut zu Weltevreden wurde nach *v. d. H. van Genderen*[3]) von 1895 bis 1899 nach relativ schwachen Pasteurschen Schemata behandelt, bei denen 1 tägiges Mark zuerst überhaupt nicht und späterhin erst am 10. oder 9. Tage gegeben wurde. Die Gesamtmortalität betrug bei 1133 Behandelten 2,7%. Von 1900 ab wurde wesentlich intensiver behandelt (1 tägiges Mark schließlich bereits am 4. bis 2. Tage). Die Mortalität bei den so behandelten 2061 Patienten war aber mit 3,1% zum mindesten nicht günstiger als vorher. (Bezüglich der relativ hohen Mortalitätsziffern sei erwähnt, daß *v. d. H. van Genderen* in seiner Tab. 6 nur tatsächliche Bißverletzungen aufführt, und daß die Eingeborenen von Java, die den Hauptanteil der Patienten ausmachen, durchweg schwere Bißverletzungen aufwiesen.)

Wie die Tab. 2 zeigt, hat der Prozentsatz der Todesfälle an Lyssa unter den in Berlin Behandelten von Periode zu Periode abgenommen, und zwar in beiden Kolumnen (totale und reduzierte Mortalität) auffallend stetig. Nun weist allerdings der Anteil der in erster Linie bedrohten Patienten der Klasse A und B an der Gesamtzahl der Behandelten ebenfalls eine Abnahme auf, aber nur in geringem Maße (von 86% auf 71%) und nur von der 1. zur 2. Periode; in der 3., in der die Mortalität mindestens in dem gleichen Grade weiter abgenommen hat, ist er ebenso groß geblieben wie in der 2. Periode. Die ständige Besserung des Behandlungserfolges ist mithin durch die relative Abnahme der A- und B-Fälle unter den Patienten nicht genügend erklärt. Andererseits aber auch nicht durch den Wechsel in der Behandlungsintensität, die zwar bei dem Übergang von der 1. zur 2. Periode verstärkt, von der 2. zur 3. aber herabgemindert wurde. Auf welchen Ursachen die Abnahme der Mortalität beruht, muß dahingestellt bleiben. Jedenfalls ergibt sich aus der Tab. 2 ebensowenig wie aus den von *Papamarku* zusammengestellten Zahlen ein Hinweis darauf, daß bei der Pasteurschen Methode die Erfolge mit zunehmender Intensität der Behandlung besser werden.

Bemerkenswerterweise zeigen auch die vom Pariser Institut mitgeteilten Zahlen eine ständige Abnahme der Mortalität, und zwar sowohl der totalen als auch der reduzierten. Die letztere betrug

1886—1898	0,44%
1899—1912	0,27%
1913—1924	0,16%

Auch im Pariser Institut hat der Anteil der A- und B-Fälle unter den Patienten im Laufe der Zeit etwas abgenommen, aber ebenfalls nicht in dem Maße, daß die Abnahme der Mortalität dadurch genügend erklärt wäre.

Wie vor kurzem mitgeteilt wurde, ist in Paris die Behandlungsmethode seit 1912 insofern abgeändert worden, als die 5—2 Tage lang getrockneten Markstückchen bis zu ihrer Verwendung in Glycerin (30° B) aufbewahrt werden. Die Behandlung dauert 16—25 Tage. Die mit dieser Methode erzielten Erfolge entsprechen ungefähr den von uns in der Periode 1917—1923 beobachteten. Die Totalmortalität beträgt nämlich bei 12 273 Patienten 0,32% gegenüber 0,45% in Berlin; die reduzierte ist in beiden Instituten die gleiche gewesen: 0,13 bzw. 0,14%. Der etwas günstigere Prozentsatz der Totalmortalität bei den Pariser Patienten wird zum Teil dadurch aufgewogen, daß der Prozentsatz der A- und B-Fälle in Berlin etwas größer als in Paris war: 71 gegenüber 59%.

Leider läßt sich die Behandlungsintensität der beiden Institute schwer miteinander vergleichen. Einmal weiß man nicht, wie weit das höhere Trocknungsalter des in Paris verwandten Markes durch die dortigen höheren Dosen aufgewogen wird. Wir haben in schweren Fällen in 21 Tagen im ganzen ein 8,4 cm langes Stück Mark von 5—1 tägigem Trocknungsalter (1 tägiges vom 8. Tage ab und im ganzen 8 mal) gegeben. In Paris wird die Behandlung in solchen Fällen auf 25 Tage ausgedehnt und nach unserer Berechnung ein 15 cm langes Stück Mark von 5—2 tägigem Trocknungsalter (2 tägiges Mark vom 9. Tage ab und im ganzen 7 mal) verabfolgt. Dazu kommt noch der unbekannte Faktor der Glycerinaufbewahrung.

Im übrigen ist es wahrscheinlich, daß außer der Menge und dem Alter des Markes an dem Behandlungserfolg auch die biologischen Eigentümlichkeiten des betr. Passagestammes wesentlich mitbeteiligt sind. Daß sich die Stämme hinsichtlich ihrer Virulenz für Kaninchen, der Inkubationszeit bei der Passageüberimpfung und in ihrer Infektiosität für verschiedene Tierarten, insbesondere auch von der Subcutis aus (*Fermi*) unterschiedlich verhalten, wissen wir, und es entspricht nur unseren Erfahrungen bei der Immunisierung mit anderen Infektionserregern, wenn wir annehmen, daß auch hinsichtlich der immunisatorischen Leistung bei den Passagestämmen Unterschiede bestehen. Diese Annahme würde es auch verständlich machen, weshalb einige Institute trotz mehrfachen Wechsels der Methode nur gerade befriedigende, andere dagegen stets ausgezeichnete Erfolge erzielt haben.

Daß die immunisatorische Wirkung mit der Virulenz für Kaninchen parallel geht, ist zum mindesten nicht bewiesen. Wir haben mit unserem schwach virulenten Stamm Berlin bei der Pasteurschen Methode durchaus befriedigende Behandlungserfolge gehabt, während umgekehrt in Weltevreden ein besonders hochvirulentes Virus bei intensivem Schema benutzt wurde, ohne daß die Resultate besonders günstig gewesen wären.

Anhang. Übersicht über die Todesfälle an Lyssa, die bei den 4399 Patienten vorgekommen sind, welche vom 1. III. 1918 (seit Abschluß der Arbeit von Papamarku) bis November 1923 nach verstärkten Schemata der Pasteurschen Methode behandelt wurden.

1. H., 14 Jahre alt, Knabe; 4. III. 1918: Biß rechte Backe und Lippen; Hund A; ab 8. III. Schema IIc; gest. 31. III., 3 Tage nach beendeter Behandlung.

2. K., 65 Jahre alt, Landmann; ca. 15. VII. 1918 Biß rechte Hand; Hund B; ab 17. IX. Schema IIc; 2. X. erkrankt; 7. X. gest., während der Behandlung.

3. Br., 9 Jahre alt, Mädchen; 30. I. 1919 Biß beide Arme und rechter Unterschenkel; Hund A; ab 7. II. Schema IIc; 15. II. erkrankt; 17. II. gest., während der Behandlung.

4. P., 31 Jahre alt, Frau; 28. IV. 1918 Biß rechten Mittelfinger; Hund B; ab 29. V. Schema IIc; 10. VI. erkrankt; 15. VI. gest., während der Behandlung.

5. B., 70 Jahre alt, Frau; 20. X. 1919 Biß rechte Hand; Hund A; ab 23. X. Schema IIc; 13. XII. gest.

6. M., 48 Jahre alt, Frau; 13. VII. 1919 Biß linkes Auge, beide Ober- und Unterarme; Hund C; ab 17. VII. Schema IIc; 29. VII. erkrankt; 8. VIII. gest., während der Behandlung.

7. B., 12 Jahre alt, Knabe; 1. VII. 1919 Biß beide Hände; Hund unbekannt; ab 7. VII. Schema IIc; 13. VIII. gest.

8. Ü., 13 Jahre alt, Knabe; 6. XII. 1920 Biß rechter Daumen; Hund A; ab 30. XII. Schema IIc; 14. I. erkrankt; 20. I. gest., während der Behandlung.

9. H., 46 Jahre alt, Frau; 25. XII. 1920 Biß rechter Daumen; Hund A; ab 17. I. Schema IIc; 20. V. gest.

10. S., 39 Jahre alt; 9. VI. 1920 Biß rechte Hand; Hund A; ab 10. VI. Schema IIc; 9. VII. erkrankt; 12. VII. gest., 12 Tage nach Abschluß der Behandlung.

11. U., 18 Jahre alt, Mädchen; 4. X. 1921 Biß rechte Wade; Hund C; ab 9. X. Schema IIc; gest. 24. VII. 1923!

12. H., 7 Jahre alt, Knabe; 26. V. 1921 Biß rechtes Knie; Hund B; ab 30. VII Schema IIc; gest. 3. I. 1922.

13. L., 3 Jahre alt, Mädchen; 5. VII. 1921 Biß nackte Wade; Hund A; ab 10. VII. Schema IIc; 27. VII. erkrankt; gest. 3. VIII., 3 Tage nach beendeter Behandlung.

14. T., $5^1/_2$ Jahre alt, Knabe; 9. XII. 1921 Biß linke Hand und linke Wade; Hund A; ab 11. XII. Schema IIc; gest. 10. I., 10 Tage nach Abschluß der Behandlung.

15. L., 63 Jahre alt, Arbeiter; Biß 1. V. 1922 linke Hand; Hund C; ab 2. V. Schema IIc; gest. 24. VI.

16. D., 11 Jahre alt, Knabe; 24. IV. 1922 Biß rechte Hand; Hund A; ab 4. V. Schema IIc; 24. V. erkrankt; gest. 30. V., 6 Tage nach Abschluß der Behandlung.

17. T., 10 Jahre alt, Knabe; 16. VIII. 1922 Biß Unterlippe, Nase, rechte Backe; Hund A; ab 21. VIII. Schema IIc; gest. 18. IX., 8 Tage nach Abschluß der Behandlung.

18. K., 38 Jahre alt, Arbeiter; 29. V. 1923 Biß rechte Augenbraue, Oberlippe; Hund unbekannt; ab 1. VI. Schema IIc; 24. VI. erkrankt; gest. 27. VI., 6 Tage nach Abschluß der Behandlung.

19. P., 22 Jahre alt; 14. X. 1923 Biß linker Daumen und Zeigefinger; Hund unbekannt; ab 16. X. Schema IIc; 15. XI. erkrankt; gest. 19. XI., 14 Tage nach Abschluß der Behandlung.

20. S., 33 Jahre alt, Hausierer; 27. II. 1923 Biß linke Hand und Daumen; Hund unbekannt; ab 14. III. Schema IIc; gest. 8. IV., 5 Tage nach Abschluß der Behandlung (Patient hat sich der Behandlung häufig entzogen und ist infolgedessen nicht vollständig behandelt).

II. Über das Vorkommen von Impflähmungen und leichteren Störungen bei der verstärkten Wutschutzbehandlung nach Pasteur.

Papamarku hat über 9 Fälle von Lähmungen und sonstigen schweren Schädigungen des Zentralnervensystems berichtet, welche bei Patienten der Berliner Wutschutzabteilung während des Zeitraumes vom 1. IV. 1914 bis 28. II. 1918 zur Beobachtung kamen. Unter 903 Patienten, welche nach relativ schweren Schemata der Pasteurschen Methode (Schema Ia und Ib, s. Tab. 1) behandelt wurden, kamen 8 derartige Erkrankungsfälle vor (= 0,89%), bei 987 Behandlungen nach einem etwas weniger intensiven Schema (IIa bis IId) dagegen nur 1 Fall (= 0,1%) und schließlich bei 263 mit 5-, 4- und 3tägigem Mark Behandelten kein Fall. Auf Grund dieser Tatsache und einer eingehenden kritischen Würdigung der Literatur gelangte *Papamarku* zu der Schlußfolgerung, daß das Auftreten von Lähmungen unter sonst gleichen Umständen von der Intensität der Behandlung abhängig, und daß eine Behandlung, bei welcher schon am 3. oder 4. Tage 1tägiges Mark gegeben wird (Schema Ia bis Ib), wenigstens bei nervös disponierten Leuten mit einer nicht unerheblichen Gefahr in bezug auf das Auftreten von Lähmungen verbunden ist. Zu der gleichen Schlußfolgerung ist neuerdings auch *v. d. H. van Genderen*[3]) gelangt.

Dank dem bereits besprochenen mehrmaligen Wechsel in der Behandlungsmethode und der außerordentlichen Zunahme unserer Patienten in den letzten Jahren verfügen wir jetzt über ein umfangreiches Material, welches die in der Arbeit von *Papamarku* mitgeteilten Beobachtungen in wesentlichen Punkten ergänzt. Eine Mitteilung unserer Beobachtungen erscheint uns um so mehr geboten, als das Problem der Impflähmungen in der letzten Zeit durch eine Reihe von Veröffentlichungen, einen Vortrag von *Kraus*[4]), die experimentellen Beiträge von *Koritschoner* und *Schweinburg*[5]), die bereits erwähnte Arbeit von *v. d. H. van Genderen*[3]) und die kasuistische Mitteilung von *Knack*[6]) von neuem aufgerollt worden ist.

Vom 1. IV. 1914 bis November 1923 wurden im ganzen 6086 Patienten nach verschieden intensiven Schemata der Pasteurschen Methode behandelt. In der Tab. 3 sind sämtliche während dieses Zeitraumes vorgekommenen Fälle von Impflähmung zusammengestellt: sowohl die 9 bereits von *Papamarku* mitgeteilten als auch die nach Abschluß seiner Arbeit beobachteten weiteren 14 Fälle.

Nach den besonders schweren Schemata Ia und Ib wurden 903 Patienten behandelt. Davon erkrankten 8 = 0,89%. Nach den Schemata der Gruppe II (vorzugsweise IIc und IId) wurden 4113 Patienten behandelt, von denen 13 = 0,32% erkrankten. Bei den mit 5—3tägigem Mark behandelten 1070 Patienten der Gruppe III kamen schließlich 2 Fälle von Impferkrankung vor = 0,19%, während in der Tab. 3 der Arbeit von *Papamarku* hier noch kein Fall zu verzeichnen gewesen war. Das könnte damit zusammenhängen, daß die Anzahl der nach Schema III Behandelten (263) damals noch zu klein war. Aber auch bei dem Schema II sind die Erkrankungen später häufiger aufgetreten, als nach dem

Material von *Papamarku* zu erwarten war. Hier ist das Material *Papamarkus* genügend groß. Es umfaßt 987 nach Schema II Behandelte mit nur 1 Lähmung (= 0,1%), während später, vom 1. III. 1918 bis November 1923, unter 807 nach dem leichtesten Schema III Behandelten 2 (= 0,25%), unter den 3126 nach Schema II Behandelten dagegen 12 Lähmungen (= 0,38%) vorkamen. Daß das auf einem Zufall beruht, ist kaum anzunehmen. Für eine Virulenzschwankung, die ja nicht auszuschließen ist, liegt kein Anhaltspunkt vor. Möglicherweise macht sich hier der bereits erwähnte Umstand geltend, daß die Patienten der Nachkriegsjahre infolge der zeitweisen Mitbenutzung der Passage*gehirne* neben dem Rückenmark zu einem großen Teil etwas anders, und zwar intensiver behandelt worden sind als bei den gleichen Schemata (IIc, IId, III) während des Krieges.

Tabelle 3. *Übersicht über die im Berliner Institut vom 1. IV. 1914 bis 1. III. 1918 (Arbeit von Papamarku) und weiter bis November 1923 vorgekommenen Impflähmungen und Todesfälle an Lyssa bei insgesamt 6086 nach Pasteurschen Schemata behandelten Patienten.*

Behandlungsschema	Jahrgang	Anzahl d. Behandelten	Anzahl der Impflähmungen	Todesfälle an Lyssa während und nach der Behandlung	Davon Todesfälle später als 14 Tage nach Abschluß der Behandlung
Ia, Ib	1914—1917 *(Papamarku)*	903	8 = 0,89%	6 = 0,66%	4 = 0,44%
IIa, b, c, d	1915—1918 *(Papamarku)*	987	1 = 0,1%	2 = 0,2%	0
desgl.	1918—1923	3126	12 = 0,38%	20 = 0,64%	6 = 0,19%
desgl.	zusammen 1915—1923	4113	13 = 0,32%	22 = 0,53%	6 = 0,15%
III	1916—1918 *(Papamarku)*	263	0	0	0
desgl.	1918—1923	807	2 = 0,25%	0	0
desgl.	zusammen 1916—1923	1070	2 = 0,19%	0	0
Alle Fälle I, II, III	1914—1923	6086	23 = 0,38%	28 = 0,46%	10 = 0,16%

Aus den in der Tab. 3 zusammengestellten Zahlen ergibt sich die für die Praxis in erster Linie wichtige Feststellung, daß die bei der Wutschutzbehandlung nach der verstärkten Methode von *Pasteur* vorkommenden Erkrankungen des Zentralnervensystems (Impflähmungen) um so häufiger auftreten, je intensiver die Behandlung ist. Die diesbezügliche Feststellung von *Papamarku* hat sich somit an dem inzwischen um etwa das 3fache vermehrten Material durchaus bestätigt.

Auf die gleichsinnige Schlußfolgerung bei *v. d. H. van Genderen* wurde bereits eingangs hingewiesen. *Koritschoner* und *Schweinburg*[5]) bemerken in den Schlußsätzen ihrer Arbeit: „Es scheint, daß späterhin bei Anwendung intensiverer Pasteur-Methoden die Lähmungen etwas häufiger geworden sind.“

Neben der Häufigkeit der Erkrankung steht bei unserem Material auch der Zeitpunkt ihres Eintrittes in Beziehung zu der Schwere der Behandlung. Von den 8 Erkrankungen, welche bei den intensiv

behandelten Fällen vorkamen, traten 5 = 62,5% vor dem 11. Tage, der Mitte der Behandlung, auf, bei den schwächeren Schemata dagegen sämtliche erst nach diesem Termin. Es ist ferner auch wohl kein Zufall, daß die beiden Fälle mit tödlichem Ausgang der Impflähmung, welche das Berliner Institut unter im ganzen 27 Erkrankungen bei der verstärkten Methode von Pasteur erlebt hat, nach dem besonders intensiven Schema Ia behandelt worden waren. Bezüglich dieser Todesfälle sei auf die Arbeiten von *Jos. Koch*[7]) und *Papamarku*[1]) verwiesen.

Papamarku hat auf *die wesentliche Rolle* hingewiesen, *die die Beschaffenheit des Zentralnervensystems bei der Entstehung der Impflähmungen spielt.*

Bei 1842 von April 1906 bis April 1914 nach Schema I behandelten Patienten kamen 4 Lähmungen vor = 1 : 460 (Durchschnittszustand der deutschen Bevölkerung vor dem Kriege), bei 724 von 1914—1918 behandelten Zivilisten dagegen 3 Fälle = 1 : 241 (Nervensystem durch die Kriegsverhältnisse beeinträchtigt). Bei 179 während des Krieges behandelten Militärpersonen ist mit 5 Impflähmungen = 1 : 36 eine weitere beträchtliche Zunahme zu verzeichnen (Nervensystem besonders stark beeinträchtigt).

Diese Feststellungen illustrieren den disponierenden Einfluß der Kriegsverhältnisse. Sie entsprechen früheren Beobachtungen verschiedener Autoren (*Babes* u. a.) und finden eine Parallele in den Zahlen, welche neuerdings *v. d. H. van Genderen*[3]) mitgeteilt hat. In Weltevreden, wo von 1895 bis 1906 nach der Methode von *Pasteur*, von 1906 ab nach *Högyes* behandelt wurde, kamen bei insgesamt 13 396 Behandelten 21 Fälle von Impflähmung vor. Dieselben zeigen insofern eine auffällige Verteilung, als 19 von ihnen auf die 4774 behandelten Europäer (= 1: 251), auf die 8622 eingeborenen Patienten dagegen nur 2 Fälle von Impflähmung entfallen (= 1: 4311).

Dieser beträchtliche Unterschied beruht offenbar darauf, daß das Zentralnervensystem der Europäer in weit höherem Grade als bei der inländischen Bevölkerung für die Erkrankung an Impflähmung disponiert ist. Die geringere nervöse Labilität der Naturvölker macht sich bekanntlich bei der Syphilis auf das deutlichste geltend; sie ist unserer Ansicht nach, wenn auch nicht der einzige, so doch wohl der hauptsächlichste Grund, weshalb Tabes und Paralyse bei ihnen so selten vorkommen. Andererseits treffen wir diese Formen der Syphilis unter den Kulturnationen bei den Männern weit häufiger als bei den Frauen an, und unter den Männern am häufigsten bei Hochgebildeten und Geistesarbeitern. Die einseitige Inanspruchnahme des Gehirns, wie sie die heutigen Zustände in gewissen Kreisen der Kulturvölker mit sich bringen, setzt die natürliche Widerstandskraft, die das Zentralnervensystem gegenüber den Erregern der Syphilis und den im Virus fixe enthaltenen Schädlichkeiten hat, in auffallender Weise herab. *v. d. H. van Genderen* mag im Recht sein, wenn er darauf hinweist, daß

die Eingeborenen manchen schwächenden Einflüssen — er führt chronische Malaria, Dysenterie, Framboesie und Ankylostomiasis an — weit mehr als die Europäer ausgesetzt seien. Bei der Impflähmung kommt es aber offenbar nicht auf eine allgemeine Schwächung des Organismus, sondern auf eine bestimmte Disposition des Zentralnervensystems an, die durch geistige Arbeit bzw. Überanstrengung bedingt wird.

Gegenüber dem Virus der Straßenwut spielt die nervöse Labilität des Zentralnervensystems offenbar keine wesentliche Rolle. *Papamarku* hebt ausdrücklich hervor, daß bei seinem Material Unterschiede in dieser Hinsicht nicht festzustellen waren und auch sonst ist meines Wissens nichts Derartiges beobachtet worden. In Weltevreden war im Gegenteil die Mortalität an Lyssa bei den behandelten Eingeborenen größer als bei den Europäern. Das hat aber nach *v. d. H. van Genderen* einen äußeren Grund: sie weisen im allgemeinen tiefere und vielfachere Verwundungen auf als die durch Kleidung und sonst besser geschützten Europäer.

Aus der Tatsache, daß die Impflähmungen um so häufiger auftreten, je intensiber die Behandlung ist, schließen wir mit zahlreichen anderen Autoren, daß sie zum mindesten ihrer Mehrzahl nach durch die Behandlung als solche hervorgerufen werden.

Diese Auffassung stützt sich ferner auf folgende Erwägungen:

Wenn es sich bei den Lähmungen um abortive Lyssa, also um Folgen des Bisses handelte, wäre zu erwarten, daß diese abgeschwächten Lyssaformen im Gegensatz zu den typischen tödlichen überwiegend nach leichten Verletzungen auftreten, mithin bei den Patienten, welche nach den leichteren Schemata behandelt wurden. In Wirklichkeit ist es aber gerade umgekehrt. Vergleichen wir die nach Schema I und II Behandelten (Tab. 3), so finden wir bei ersteren 0,66%, bei letzteren 0,53% Todesfälle an Tollwut. In beiden Kategorien sind die durchschnittlichen Verletzungen zweifellos weit gefährlicher gewesen als bei den nach Schema III Behandelten (mit keinem Todesfall), und zwar bei der Kategorie I noch etwas schwerer als bei II, wenn auch der Unterschied nicht erheblich ist. Die Lähmungen sind aber bei der Gruppe Schema I beinahe 3mal so häufig als bei II (0,89% gegen 0,32%). Das ist begreiflich, wenn man sie als Folgen der Impfung auffaßt, da eben die Gruppe I viel intensiver behandelt wurde als II.

Wenn man dagegen die Lähmungen als Folge der Bißverletzung auffaßt, so ist es schwer erklärlich, daß bei den im Durchschnitt leichter Verletzten der Gruppe II überwiegend schwere Lyssa (22 Todesfälle gegenüber 13 Lähmungen), bei den etwas schwerer Verletzten der Gruppe I dagegen ungefähr gleich viele tödliche und leichte Lyssafälle (6 Todesfälle an Lyssa, 1 an „atypischer“ Lyssa gegen 7 zur Heilung gekommene Fälle), auftraten. (Von den 8 Fällen von Impflähmung der Gruppe I ist einer tödlich verlaufen. Vgl. *Papamarku.*)

Auch die Zahlen, welche *Simon*[8]) über die Häufigkeit der Impflähmungen in den verschiedenen Instituten zusammengestellt hat, sprechen für die ursächliche Bedeutung der Behandlungsintensität.

Von besonderem Gewicht ist aber das *Vorkommen von Lähmungen in Fällen, wo der betr. Hund gesund befunden wurde, oder wo gar kein Biß vorlag. Papamarku* hat bereits diese Fälle zusammengestellt. Seitdem sind folgende hinzugekommen:

Bei einem Patienten *Schweinburgs*[5]) (Fall 23), der nach 10tägiger Behandlung an Gesichtsparese erkrankte, ergab die 2malige amtstierärztliche Untersuchung die völlige Gesundheit des betreffenden Hundes. Nach *v. d. H. van Genderen*[3]) erkrankten im Institut zu Weltevreden 2 dort tätige Ärzte, die weder gebissen noch geleckt waren und sich nur prophylaktisch behandeln ließen, an typischer Impflähmung. Mit diesen 2 Fällen, den von *Simon*[8]) und von *Pelser* zitierten und dem von *Pfeilschmidt*[9]) veröffentlichten Fall liegen in der Literatur nunmehr eine beträchtliche Anzahl von Mitteilungen über Impflähmungen vor, bei denen gar keine Bißverletzung stattgefunden hatte.

Besondere Beachtung verdient auch der Fall eines in dem Institut zu Weltevreden behandelten Knaben. Derselbe war von einem Affen gebissen worden, der zunächst spurlos verschwunden war und bei dem der Verdacht bestand, daß er an Lyssa eingegangen war, der später aber gesund wiedergefunden wurde. Das vorsichtshalber behandelte Kind erkrankte und starb an Impflähmung. Von 5 mit seinem Gehirn geimpften Kaninchen starben 4 nach 8, 11, 11 bzw. 14 Tagen, ein Kaninchen in 2. Passage nach 7 Tagen an typischer Passagewut.

In Fällen, wo wirklich eine Bißverletzung stattgefunden hat, kann man allerdings immer auf die Möglichkeit hinweisen, daß Tiere ausnahmsweise auch einmal bereits längere Zeit vor ihrer Erkrankung infektiös sein, oder daß sie nach einer Lyssaerkrankung genesen können.

Hermann[11]) berichtet von einem an Tollwut eingegangenen Hunde, der 56 Tage vor seinem Ende einen jungen Mann gebissen hatte. Der Gebissene, der von keinem anderen Hunde verletzt worden war, ließ sich nicht behandeln und starb etwa $2^1/_2$ Monate nach dem Biß an typischer Lyssa.

Solche Vorkommen sind aber nach allen Erfahrungen etwas äußerst Seltenes und es wäre sehr gezwungen, sie für die Erklärung der Fälle, in denen es zu Impflähmung kam, während der Hund innerhalb der üblichen Beobachtungszeit gesund blieb, heranziehen zu wollen.

Bei den von *Papamarku* beschriebenen 9 Patienten mit Impflähmung war die Untersuchung des betr. Hundes auf Tollwut in 4 Fällen völlig negativ ausgefallen. Die nach Abschluß seiner Arbeit bis zum November 1923 vorgekommenen 14 Fälle betrafen mit einer Ausnahme (Bißverletzung durch einen unbekannten Hund) sämtlich Patienten, die durch Tiere der Klassen A und B und in 1 Fall (Kratzverletzung) durch einen lyssakranken Menschen verletzt worden waren.

Bei einem von den 14 Fällen handelte es sich um einen Knaben von 8 Jahren, welcher, am 4. X. von einem tollen Hund (A) in den rechten Fuß gebissen und vom 8. X. ab nach Schema III behandelt, am 22. X. unter dem Bilde eines schweren Meningismus erkrankte. Am 30. X. noch leichte Nackenstarre. Am 1. XI. Angina, Fieber; am 2. XI. Scharlachausbruch. Ab 17. XI. gesund. — Mit am 23. X. entnommenem Lumbalpunktat subdural bzw. intracerebral geimpfte Kaninchen (2) blieben gesund. — Die meningitischen Erscheinungen mit der nach Verlegung des Knaben in ein Krankenhaus eingetretenen Scharlacherkrankung in Verbindung zu setzen, liegt angesichts der relativ langen Zwischenzeit und der kurzen Inkubationszeit des Scharlachs (4—7 Tage) kein Grund vor. Der Meningismus ist nach unserer Auffassung durch die Wutschutzbehandlung hervorgerufen worden. Wir haben den Fall deshalb in unserer Zusammenstellung mitgezählt,

obwohl Lähmungserscheinungen bei ihm nicht beobachtet wurden. Eine Patientin, die gegen Ende einer Behandlung nach Schema III an Lähmung beider Arme erkrankte, wies ebenfalls Symptome einer meningitischen Reizung auf.

Dafür, daß die Wutschutzbehandlung an sich zu Erkrankungen des Zentralnervensystems führen kann, spricht meines Erachtens auch die Tatsache, daß ein erheblicher Teil der Patienten während oder nach der Behandlung an nervösen Beschwerden leidet. Ein Auftreten von allgemeinem Unwohlsein, Müdigkeit, Kopf-, Kreuz- und Gliederschmerzen während der Behandlung ist durchaus nichts seltenes und seit langem bekannt. Wir pflegen die Behandlung bei derartigen Beschwerden, die sich bei der Pasteurschen Methode meist um den 8. Tag einstellen, für 1 Tag auszusetzen, insbesondere, wenn sie mit auffallender Blässe der Gesichtsfarbe verbunden sind. Die Kreuz- und Gliederschmerzen machen durchaus den Eindruck einer zentralen Reizung.

Knack[6]) berichtet über einen Patienten, bei dem während der Behandlung absolute Pupillenstarre eintrat, die erst nach mehreren Wochen zurückging. In 4 Fällen traten nach Abschluß der Behandlung heftige Kopfschmerzen auf, die sich noch über Monate hinaus bemerkbar machten. *Knack* hat einen großen Teil seiner Patienten einer eingehenden klinischen Beobachtung unterzogen und ist dabei zu der Auffassung gelangt, *daß die Schutzimpfung unter den klinischen Erscheinungen einer leichten Infektion verläuft.*

Über den Gesundheitszustand der Patienten nach beendeter Behandlung hat neuerdings *Schweinburg*[5]) sehr beachtliche Mitteilungen gemacht. Unter anderem konnte er bei nicht weniger als 40 von 2000 nachuntersuchten Patienten objektive Symptome neurologischer Störungen nachweisen: hyper- oder hypästhetische Zonen, Reflexabschwächungen u. dgl. Solche Fälle bilden nach *Schweinburg* fließende Übergänge von denjenigen Patienten, die die Behandlung völlig reaktionslos vertragen zu den Fällen mit ausgesprochener Impflähmung. Ich habe keine systematischen Untersuchungen über den Gesundheitszustand der Patienten während und nach der Behandlung angestellt, vielmehr bei glattem Verlauf der Behandlung absichtlich alles vermieden, was über eine möglichst unauffällige Beobachtung der ohnehin beunruhigten Patienten hinausging und mich nach der Entlassung im allgemeinen mit dem Resultat der kreisärztlichen Kontrolle begnügt. Es ist uns jedoch ebenfalls bekannt, daß auch nach der Behandlung hartnäckige und zu erheblichen Beschwerden führende nervöse Störungen vorkommen: allgemeine Unruhe, Schlaflosigkeit, Kopfschmerzen, Neuralgien und andre Anzeichen neuritischer oder zentraler Reizung.

Die Möglichkeit, daß es sich bei dem einen oder anderen Fall der in der Literatur als Impflähmung mitgeteilten Fälle um abortive Lyssa

im Sinne von *Jos. Koch*[7]) gehandelt hat, läßt sich nicht von der Hand weisen. Schon deshalb nicht, weil es nicht gerade wahrscheinlich ist, daß die Lyssa im Gegensatz zu allen anderen Infektionskrankheiten in jedem Falle tödlich enden sollte. Bei typischen Lyssasymptomen scheint allerdings eine Heilung nicht beobachtet zu sein.

Ich fasse meine Auffassung der Impflähmungen dahin zusammen, daß sie zum mindesten in ihrer überwiegenden Mehrzahl nicht auf die Bißverletzung, sondern auf die Schutzimpfung zurückzuführen sind und demnach durch die Änderung des Impfverfahrens eingeschränkt werden können. Darauf kommt es aber, wie schon *Papamarku* hervorgehoben hat, für die Praxis an. Auf die weitere Frage, ob die Lähmungen durch das lebende Virus fixe, durch Wuttoxine oder durch die artfremde Nervensubstanz hervorgerufen werden, gehe ich in Abschnitt VI dieser Arbeit näher ein.

III. Die Behandlungsmethode nach Högyes-Phillips.

Wie bereits erwähnt, haben wir im November 1923 die Behandlung mit getrocknetem Passagemark nach *Pasteur* verlassen und eine neue Methode eingeführt, die sich im wesentlichen, in der Anwendung von kleinen Dosen virulenten Passagegehirns, an die Methode von *Högyes* anlehnt, dabei aber eine Aufbewahrung und Versendung des Impfstoffes nach außerhalb gestattet. Die Gründe für diesen Behandlungswechsel waren zum Teil äußerer Natur, indem die damalige wirtschaftliche Lage in Deutschland eine teilweise Dezentralisierung der Behandlung notwendig machte, die mit der Pasteurschen Methode nicht durchzuführen war. (Vgl. unten S. 183.) Dann hofften wir, die bedauerlichen Vorkommen von Impflähmung auf ein Minimum einschränken zu können, wenn wir eine Behandlung nach dem Prinzip und der Dosierung von *Högyes* einführten, bei dessen Originalverfahren derartige Störungen in Budapest äußerst selten vorgekommen sind.

Unsere Modifikation der Högyesschen Methode schließt sich an ein Verfahren an, welches von *Phillips*[2]) angegeben und in Nordamerika bereits in ziemlich umfangreichem Maße und anscheinend mit gutem Erfolg zur Anwendung gelangt ist.

Seine Grundlage bildet die Feststellung (*Phillips*), daß eine 15proz. Emulsion von frischem Passagegehirn in konzentriertem Glycerin bei anaerober Aufbewahrung im Kühlschrank bei —2 bis —4° ihre ursprüngliche Virulenz lange Zeit bewahrt. Die Virulenzprüfung wurde in der Weise vorgenommen, daß zunächst die kleinste Menge des frisch entnommenen Passagegehirns bestimmt wurde, welche bei intracerebraler Injektion bei Kaninchen noch eben zu typischer Passagewut führt. Bei der Haltbarkeitsprüfung wurde dann die aufbewahrte Glycerinemulsion mit physiologischer Kochsalzlösung so weit verdünnt, daß ein intracerebral applizierbares Quantum der Verdünnung die bestimmte Menge Gehirn enthielt. Starben die Kaninchen an Passagewut, war damit erwiesen, daß die

Virulenz, welche, in Anlehnung an *Harris*[12]), in exakter Weise auf ein bestimmtes Quantum von Infektionseinheiten bezogen ist, keinen nachweisbaren Verlust erlitten hatte.

Die tödliche Minimaldosis hat naturgemäß nur Annäherungswert. Das ist einmal in der Schwierigkeit begründet, kleinste Flüssigkeitsmengen ganz exakt intracerebral oder subdural zu applizieren. Dann ist aber auch anzunehmen, daß die Gehirne der ante finem getöteten Passagekaninchen auch bei dem gleichen Virus nicht in jedem Fall die gleiche Infektiosität aufweisen. Schon bei der gewöhnlich geübten Weiterverimpfung mit relativ großen Gehirn- bzw. Markmengen kommen, wenn auch selten, Ausfälle vor. Sie werden um so häufiger, je mehr man mit der Infektionsdosis herabgeht. *Phillips* hat deshalb die Minimaldosis seines Stammes für die Praxis auf 0,015 mg Passagegehirn festgesetzt, obwohl derselbe meist in beträchtlich kleineren Dosen, bisweilen sogar noch mit 0,0015 mg wirksam war.

Es gelang *Phillips*, seine Emulsionen bis zu 2 Jahren ohne Virulenzverlust aufzubewahren. Das war aber nur dann möglich, wenn sie vor jedem Zutritt von Sauerstoff geschützt wurden. Da der Gehalt des Glycerins an absorbiertem Sauerstoff um so größer ist, je mehr Wasser es enthält, verwendet *Phillips* nur hochkonzentriertes. Die fertige Emulsion wird in Ampullen abgefüllt, welche mit Hilfe von unbenutzbarer Watte in je ein großes Reagensglas montiert werden. Das Reagensglas wird darauf noch mit einem mit Kalilauge und Pyrogallol getränkten Bausch von benetzbarer Watte beschickt, welche von der Ampulle durch eine Schicht unbenetzbarer Watte getrennt ist und schließlich mit einem Gummistopfen verschlossen. Wenn die Emulsion einfach in kühl gehaltenen, bis in die Halsverengerung hinein gefüllten Ampullen, ohne besondere Fernhaltung des Sauerstoffs, aufbewahrt wurde, trat innerhalb von 6—8 Monaten gleichfalls kein Virulenzverlust ein.

Für den Gebrauch wird die Glycerinemulsion mit physiologischer Kochsalzlösung (mit 0,5 proz. Phenolzusatz) soweit verdünnt, daß die gewöhnliche Tagesdosis von 15 mg Virus fixe in 2 ccm enthalten ist. Die Behandlungsdauer betrug bei *Phillips* je nach der Bedenklichkeit des Falles 11—19 Tage, die täglich gleiche Dosis 15 mg Passagegehirn; insgesamt werden also 165—285 mg Virus fixe verabfolgt. Der Behandlung mit dem lebenden Virus geht eine 3tägige mit je 60 mg abgetötetem voraus. Zwecks Abtötung wird die mit 0,5 proz. Carbol-Kochsalzlösung verdünnte Emulsion für 24 Stunden in den 37°-Schrank gestellt.

Phillips berichtet über 1540 nach seiner Methode behandelten Patienten. Bei diesen ist 1 Todesfall an Lyssa (Gesichtsbiß; Erkrankung innerhalb der ersten 14 Tage nach der Behandlung), dagegen keine Impflähmung vorgekommen, während früher, bei einer modifizierten Methode nach *Pasteur* unter 1680 Behandelten 8 Todesfälle an Lyssa (= 0,47% — ungefähr der gleiche Prozentsatz wie bei uns) zu verzeichnen gewesen waren.

Der Impfstoff wurde, anscheinend ohne Einschränkung, an praktische Ärzte abgegeben, und zwar in gebrauchsfertigen Verdünnungen mit 0,5 proz. Phenolzusatz (*Phillips* erwähnt jedoch auch die Versendung der Stammemulsion nach außerhalb). Über die Kontrolle der Behandelten werden keine näheren Angaben gemacht. Bezüglich der auswärtigen Behandlungen stellt *Phillips* übrigens fest, daß viele Patienten während der warmen Jahreszeit statt mit lebendem in Wirklichkeit mit totem Virus behandelt worden sind, da der phenolversetzte Impfstoff inzwischen seine Infektiosität verloren hatte. Der Erfolg war in solchen Fällen aber im ganzen ausgezeichnet. Der Autor erblickt hierin eine weitere Bestätigung der immunisatorischen Wirksamkeit des toten Virus.

Eine Nachprüfung des Verfahrens von *Phillips* erschien uns um so mehr geboten, als es nicht nur eine wesentliche Vereinfachung gegenüber den bisherigen Methoden zu bedeuten schien, sondern auch unserem damaligen Bedürfnis entsprach: einen im Kaninchenverbrauch sparsamen, haltbaren und nach außerhalb versendbaren Impfstoff zur Verfügung zu haben. Eine derartig lange Erhaltung der Virulenz, wie sie *Phillips* bei seinem Impfstoff erzielt hat, ging aber über unsere Bedürfnisse, denen mit einer Haltbarkeit während einiger Wochen gedient war, weit hinaus.

Wir haben uns daher auf die für unsere Zwecke zunächst genügende Feststellung beschränkt: wie lange eine in Glasstöpselflaschen eingefüllte und im Eisschrank aufbewahrte sterile Emulsion von 1 Teil Passagegehirn in 9 Teilen Glycerin ihre ursprüngliche Virulenz behält.

Wir zerschütteln das frisch entnommene Gehirn der in extremis getöteten Kaninchen nach Bestimmung seines Gewichts in einer Glasperlenflasche zu einem feinen Brei und versetzen es dann unter weiterem Schütteln mit 9 Teilen bei ca. 180° sterilisierten, im Eisschrank abgekühlten Glycerins vom spez. Gewicht 1,26. Die so hergestellte Emulsion wird mit der Pipette in braune Glasstöpselflaschen von 5, 10 oder 20 ccm Inhalt eingefüllt, und zwar, um den Zutritt von Sauerstoff nach Möglichkeit einzuschränken, bis in die Halsverengerung hinein. Die Fläschchen werden im Eisschrank aufbewahrt. Verwendet werden nur solche Emulsionen, die sich als steril erwiesen haben (Prüfung durch Einsaat von je 1 Öse Emulsion in Bouillon und Serumbouillon, von Zeit zu Zeit auch in Traubenzucker-Leber-Bouillon mit Vaselinesiegel). Wie *Knack*[6]) berichtet, sind die an die Hamburger Behandlungsstelle gesandten Emulsionen in allen Fällen keimfrei gewesen.

Da unser Virus fixe-Stamm, welcher seit 1898 zur Herstellung des Wutschutzimpfstoffes nach der Methode von *Pasteur* benutzt worden ist, in den letzten Jahren relativ spät zur Erkrankung und zum Tod der Passagekaninchen geführt hatte (im Mittel nach 7,83 bzw. 12,25 Tagen), lag die Vermutung nahe, daß er im Laufe der Zeit von seiner ursprünglichen Virulenz eingebüßt hatte. Diese Vermutung fand sich insoweit bestätigt, als die tödliche Minimaldosis im Gegensatz zu dem von *Phillips* benutzten Stamm sehr groß war. 0,015, 0,05 und 0,24 mg Passagegehirn erwiesen sich bei intracerebraler Injektion als unwirksam. Erst die Dosis von 0,9 mg führte zu typischer Erkrankung und Tod nach $13^1/_2$ Tagen. Die Virulenz für Kaninchen war also etwa 60 mal schwächer als bei dem von *Phillips* benutzten Stamm.

Obwohl das schwachvirulente Virus fixe „Berlin" bei der Behandlung nach *Pasteur* durchaus gute Erfolge gezeitigt hatte (vgl. Abschnitt I) haben wir, um bei der neuen Methode in dieser Hinsicht dieselben Bedingungen wie *Phillips* zu haben, abwechselnd 2 Stämme von höherer Virulenz für Kaninchen benutzt. Dagegen sind wir in anderer Hinsicht von *Phillips* abgewichen; wir haben sogleich mit lebendem

Virus begonnen, aber eine weit kleinere Gesamtdosis gegeben, beides entsprechend der Originalmethode von *Högyes*.

Von dem uns vom Breslauer Institut überlassenen Passagevirus führte 0,02 mg Passagegehirn (aus einer 2 Tage alten Glycerinemulsion) bei intracerebraler Injektion zu typischer Passagewut. Die Inkubationszeit bis zur Erkrankung der Kaninchen betrug bei den Passageverimpfungen im Mittel 4,2, bis zum Tode bzw. kurz ante finem 6,6 Tage. Von einem Virus fixe-Stamm, der uns von dem Budapester Institut abgegeben wurde, führte 0,02 mg Gehirn zu typischer Passagewut. Die Inkubationszeiten betrugen im Mittel 4,2 bzw. 7,8 Tage. — Diese Virus fixe-Stämme entsprechen also hinsichtlich der Virulenz für Kaninchen annähernd dem von *Phillips* benutzten.

Im folgenden seien die nach dem Prinzip von *Harris* und *Phillips* festgestellten tödlichen Minimaldosen einiger Virus fixe-Stämme nebeneinandergestellt. Sie zeigen erhebliche Differenzen, die es als wünschenswert erscheinen lassen, alle zur Behandlung benutzten Stämme quantitativ zu untersuchen. Auf diese Weise läßt sich vielleicht die wichtige Frage einer Klärung näherbringen, welchen Einfluß die Kaninchenvirulenz eines Passagevirus auf seine immunisatorische Leistung und zweitens auf die Häufigkeit der Impflähmungen hat.

Daß die Virulenz bei der Wutschutzbehandlung von Bedeutung ist, wird zwar vielfach angenommen, ist jedoch nicht erwiesen. Die guten Behandlungserfolge, die in manchen Instituten mit wenig virulentem oder gar abgetötetem Impfstoff erzielt worden sind, können jedenfalls zu Zweifeln in dieser Hinsicht Veranlassung geben. Bezüglich der mit unserem schwach virulenten Stamm „Berlin" bei der verstärkten Pasteurschen Methode erzielten Behandlungsresultate sei nochmals auf den Abschnitt I dieser Arbeit verwiesen.

Die Dosis letalis minima betrug bei dem Virus fixe:

Berlin	0,9	mg Passagegehirn
Phillips[2])	0,015	„ „
Weltevreden[3])	0,0025	„ „
Harris[12])	0,025	„ Passagemark
Smolensk[10])	0,08	„ „

Über die Haltbarkeit der im Eisschrank aufbewahrten Glycerinemulsion geben die Tab. 4 und 5 Auskunft.

Tabelle 4.
Virulenzprüfungen an Glycerinemulsionen des Virus fixe-Stammes „Berlin".

Alter der Emulsion	Dosis in mg	Art der Injektion	Erkrankung der Kaninchen
27 Tage	1,5	subdural	bleibt gesund
41 „	1,6	„	in extremis getötet nach 12 Tagen
46 „	1,0	intracerebral	„ „ „ „ 12 „
46 „	1,0	„	† nach $14^1/_2$ Tagen
174 „	2,0	subdural	in extremis getötet nach 16 Tagen
309 „	1,0	„	bleibt gesund
309 „	2,0	„	„ „

Tabelle 5. *Haltbarkeitsprüfungen an Glycerinemulsionen des Virus fixe-Stammes „Breslau" an Kaninchen.*

Alter der Emulsion	Dosis in mg	Art der Injektion	Erkrankung der Kaninchen
2 Tage	0,02	intracerebral	in extremis getötet nach 7 Tagen
37 „	0,03	subdural	„ „ „ „ 10 „
40 „	0,02	intracerebral	„ „ „ „ 8 „
54 „	0,066	subdural	„ „ „ „ 7 „
64 „	0,03	intracerebral	† nach 7 Tagen
101 „	0,03	„	in extremis getötet nach 8 Tagen
122 „	0,1	„	† nach 8 Tagen
184 „	0,8	subdural	bleibt gesund

Der Umstand, daß das mit 1,5 mg aus einer 27 Tage alten Emulsion „Berlin" geimpfte Kaninchen gesund blieb, erklärt sich wohl dahin, daß die Minimaldosis von 1 mg, die ja in dem Vorversuch (0,9 mg) erst nach $13^1/_2$ Tagen zum Tode geführt hatte, reichlich niedrig bemessen ist.

Auf Grund der Prüfungen nehmen wir an, daß die im Eisschrank aufbewahrten Emulsionen innerhalb von 2 Monaten im praktischen Sinn keinen Virulenzverlust erleiden. Es erscheint uns aber zweckmäßig, die Verwendungsdauer der Impfstoffes auf etwa 14 Tage zu bemessen, auch schon mit Rücksicht auf die Möglichkeit einer nachträglichen bakteriellen Verunreinigung. Nach unseren vorläufigen Untersuchungen tötet konzentriertes Glycerin bei kühler Aufbewahrung eingesäte Strepto- und Staphylokokken innerhalb 2—3 Wochen nicht ab.

Zum Gebrauch bei der Wutschutzbehandlung verdünnen wir die Glycerinemulsion im Verhältnis 1 : 25 mit physiologischer Kochsalzlösung und benutzen folgendes

Behandlungsschema.

Behandlungstag	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Impfstoffmenge in Kubikzentimetern	0,25	0,5	0,75	0,75	1,25	1,25	2,0	0,75	0,75	0,75
= Virus fixe Milligramm	1	2	3	3	5	5	8	3	3	3

Behandlungstag	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.
Impfstoffmenge in Kubikzentimetern	1,25	1,25	1,25	2,0	0,75	0,75	1,25	1,25	1,25	2,5
= Virus fixe Milligramm	5	5	5	8	3	3	5	5	5	10

Im ganzen werden mithin in 20 Behandlungstagen 90 mg Virus fixe verabfolgt, was etwa der ursprünglichen Dosierung von *Högyes* entspricht, aber beträchtlich unterhalb der von *Phillips* angegebenen und, wie unten noch ausgeführt wird, auch weit unterhalb der jetzt in Budapest, Wien und Weltevreden gebräuchlichen Dosen bleibt.

Die Verdünnungen des Impfstoffes sind mindestens jeden Tag neu herzustellen und vor Licht und Wärme zu schützen.

IV. Über die Erfolge bei der Wutschutzbehandlung nach der modifizierten Högyes-Phillipsschen Methode.

Vom November 1923 bis zum 31. XII. 1924 wurden insgesamt 1266 Patienten behandelt. Von diesen waren 710 Fälle der Pasteurschen Klassen A und B., davon 291 Fälle von bedenklicher Art: Bißverletzungen durch tolle Tiere im Gesicht (23) oder an den Händen (268 Fälle).

Bis zum 31. III. 1925 sind 110 weitere, im ganzen also 1376 Patienten behandelt worden [769 Fälle der Gruppen A und B, darunter 26 mit Bißverletzungen im Gesicht oder am Kopf, 297 mit solchen an den Händen*)].

Bezüglich des für die Berliner Station ungewöhnlich kleinen Prozentsatzes der A- und B-Fälle — 56% — sei bemerkt, daß 1924 zahlreiche Bißverletzungen durch unbekannte Hunde vorkommen und bei der weiten Verbreitung der Tollwut in Behandlung genommen werden mußten.

Von den 1266 bis zum 31. XII. 1924 und der weiter vom 1. I. bis zum 31. III. 1925 in Behandlung genommenen 110 Patienten sind bis jetzt (Ende Februar 1926), also 14 bzw. 11 Monate nach Abschluß der Behandlung 3 Behandelte an Lyssa gestorben.

1. P., Rentner, 70 Jahre alt; Bißverletzung am rechten Auge am 20. XII. 1923 durch tollen Hund (A); Behandlung 2. I. bis 21. I. 1924; 22. I. erkrankt, 26. I. gestorben an Lyssa.

2. K., Knabe, 6 Jahre alt; mehrfache Bißverletzungen etwa am 25. IV. 1924 durch tollen Hund (A); Behandlung ab 17. V.; erkrankt am 30. V. (14. Behandlungstag), gestorben am 31. V. an Lyssa.

3. R., Mädchen, 7 Jahre alt; Bißverletzung am linken Ohr und an der linken Hand am 9. III. 1925 durch tollen Hund (A); Behandlung ab 11. III.; am 29. III. (19. Behandlungstag) erkrankt, am 31. III. gestorben an Lyssa.

Die Erkrankung trat bei den 3. Patienten während oder in unmittelbarem Anschluß an die Behandlung auf. Im Sinne von *Pasteur* würden diese Todesfälle nicht als Mißerfolge zu buchen sein. Wenn auch bei dem Vergleich der Statistiken verschiedener Behandlungsmethoden in erster Linie die Gesamtmortalität heranzuziehen ist, so ist doch darauf hinzuweisen, daß die in Rede stehenden 3 Fälle besonders ungünstig lagen. Einmal handelte es sich um Bißverletzungen im Gesicht bzw. am Ohr, im letzteren Falle neben einem Handbiß. Dann aber kam ein Patient erst 13 Tage, ein anderer sogar 3 Wochen nach der Verletzung in Behandlung.

In der Tab. 6 sind die Todesfälle an Lyssa und die im nächsten Abschnitt zu besprechenden Impflähmungen, die bei den nach der neuen Methode in Berlin behandelten Patienten vorgekommen sind,

*) Außerdem sind eine Anzahl Patienten mit von uns abgegebenem Impfstoff auswärts behandelt worden. Die in den *ständigen auswärtigen Behandlungsstellen* Behandelten werden S. 169 gesondert besprochen.

Tabelle 6. *Übersicht über die Todesfälle an Lyssa und über die Impflähmungen bei den vom 1. IV. 1914 bis November 1923 nach verstärkter Pasteurscher Methode und bei den von November 1923 bis zum 31. III. 1925 (bzw. 31. XII. 1925) nach Högyes-Phillips behandelten Patienten der Berliner Station.*

Art der Behandlung	Zeitraum	Anzahl der Behandelten	Todesfälle an Lyssa	Davon später als 14 Tg. n. Abschluß d. Behandl.	Impflähmungen	Davon tödlich verlaufen
Pasteur Schema I, II, III	1914—1923	6086	28 = 0,46%	10 = 0,16%	23 = 0,38%	1 = 0,016%
Högyes-Phillips	Nov. 1923 bis 31. III. 1925	1376	3 = 0,22%	0	·	·
desgl.	Nov. 1923 bis 31. XII. 1925	1774	·*)	·	3 = 0,17%	2 = 0,11%

*) Unter den 398 vom 1. IV. 1925 bis 31. XII. 1925 Behandelten sind Todesfälle an Lyssa nicht vorgekommen, doch ist die Beobachtungszeit noch nicht abgelaufen.

zusammengestellt. Zum Vergleich habe ich die Resultate der Behandlung nach *Pasteur* in den vorhergehenden 10 Jahren mit aufgenommen.

Die Mortalität an Lyssa unter unseren nach der neuen Methode behandelten Patienten ist mit 0,22% *erheblich niedriger als früher bei der Pasteurbehandlung*, aber etwas größer als diejenige, welche *v. d. H. van Genderen* unter 2421 von 1912 bis 1922 nach *Högyes* behandelten Europäern beobachtete (0,16%). Die letzteren sind allerdings mit weit höheren Dosen als bei uns behandelt worden, nämlich je nach der Schwere der Verletzung mit 92—605 mg Virus fixe, und zwar von einem Stamm mit sehr hoher Kaninchenvirulenz (s. S. 165). Andererseits scheint es sich bei den europäischen Patienten in Java auch vorwiegend um leichte Fälle gehandelt zu haben. Bei den in der Tab. 6 der Arbeit von *v. d. H. van Genderen* zusammengestellten 4895 Fällen mit tatsächlicher Bißverletzung, die nach *Högyes* behandelt wurden, ist die Mortalitätsziffer beträchtlich größer, nämlich 1,9%. Unter diesen sind aber die Mehrzahl Eingeborene, die, wie oben erwähnt, im allgemeinen gefährlichere Verletzungen aufwiesen als die Europäer.

Im übrigen tritt an den Zahlen dieser Tabelle die bemerkenswerte Tatsache in Erscheinung, daß eine sehr gesteigerte Intensität der Behandlung doch von einer deutlichen Besserung der Resultate begleitet sein kann. Bei einer Verabfolgung von 35—198 — 765 mg (je nach der Schwere der Verletzung) betrug die Mortalität 2,6%. Sie fiel auf 1,2%, als 92 — 1015 mg gegeben wurden, und stieg bei Herabsetzung der Dosen auf 92—605 mg wieder auf 2% an. Die Unterschiede treten noch deutlicher in Erscheinung, wenn man nur die Fälle, die in den ersten 7 Tagen zur Behandlung kamen, berücksichtigt: 2,6, 0,83 bzw. 1,56%. Bei der Behandlung nach *Högyes* trat mithin

in Weltevreden, ganz im Gegensatz zu den dortigen und zu unseren oben besprochenen Erfahrungen bei der Methode von *Pasteur*, eine weitgehende Parallelität der Behandlungserfolge mit der Intensität der Behandlung in Erscheinung. Im übrigen fallen die überaus hohen Dosen des für Kaninchen besonders virulenten Passagevirus etwas aus dem Rahmen der von Europa gewohnten Zahlen heraus.

In den ständigen auswärtigen Behandlungsstellen (vgl. den Anhang S. 183) sind bis zum 31. III. 1925 insgesamt 1844 Patienten mit von uns abgegebenem Impfstoff (Glycerinemulsion) behandelt worden. Davon ist unseres Wissens 1 Patient (Bißverletzung im Gesicht) an Lyssa gestorben. Über die Ergebnisse bei der auswärtigen Behandlung gibt die Tab. 7 Auskunft. In der Tab. 8 sind dann noch sämtliche in Berlin und auswärts nach *Högyes-Phillips* behandelte Patienten zusammengefaßt und die Ergebnisse denjenigen bei der Behandlung nach *Pasteur* gegenübergestellt. Außerdem enthalten die Tabellen die Fälle von Lähmungen, die im folgenden Abschnitt besprochen werden.

Tabelle 7. *Übersicht über die Fälle von Lyssa und Impflähmung bei den vom November 1923 bis zum 31. III. 1925 bzw. 31. XII. 1925 an auswärtigen Stellen nach der Methode Högyes-Phillips Behandelten.*

Zeitraum	Anzahl der Behandelten	Todesfälle an Lyssa	Davon später als 14 Tage nach Abschluß d. Behandlung	Impflähmungen	Davon tödlich verlaufen
November 1923 bis 31. III. 1925 . .	1844	1 = 0,05%	0	·	·
November 1923 bis 31. XII. 1925 . .	2289	·	· ·	2 = 0,09%	1 = 0,04%

Tabelle 8.

Übersicht über die Fälle von Lyssa und Impflähmung bei den vom 1. IV. 1914 bis November 1923 in der Berliner Station nach der Methode von Pasteur und bei den vom November 1923 bis zum 31. III. 1925 bzw. 31. XII. 1925 in Berlin und an auswärtigen Stellen nach der Methode Högyes-Phillips Behandelten.

Zeitraum	Behandlungsmethode	Anzahl der Behandelten	Todesfälle an Lyssa	Davon später als 14 Tg. n. Abschluß d. Behandl.	Impflähmungen	Davon tödlich verlaufen
1. IV. 1914 bis Nov. 1923 .	*Pasteur*	6086	28 = 0,46%	10 = 0,16%	23 = 0,38%	1 = 0,016%
Nov. 1923 bis 31. III. 1925	*Högyes-Phillips*	3220	4 = 0,12%	0	·	·
Nov. 1923 bis 31. XII. 1925	desgl.	4063	·	·	5 = 0,123%	3 = 0,075%

Hiernach stellt sich das Gesamtergebnis bei der Högyes-Phillips-Methode noch günstiger als es oben (für die Berliner Station allein)

angegeben wurde; die Lyssamortalität beträgt nur 0,12% (statt 0,22%); die reduzierte Mortalität bleibt 0.

Leider wird dieses günstige Bild durch das Vorkommen vereinzelter schwerer Impfschädigungen getrübt.

V. Über Impflähmungen bei der Behandlung nach Högyes-Phillips.

Unter 1774 bis zum 31. XII. 1925 nach der neuen Methode in der Berliner Wutschutzstation behandelten Patienten haben wir 3 Fälle von Impflähmung (= 0,17%) zu verzeichnen gehabt, von denen 2 (= 0,11%) tödlich verlaufen sind. Über die beiden bis zum 31. III. 1925 vorgekommenen Fälle gebe ich nachfolgende Daten.

1. J., 56 Jahre alt, Zollbeamter, am 13. V. 1924 von einer verdächtigen, später aber mit Wahrscheinlichkeit gesund wiedergefundenen Katze in die rechte Hand gebissen; Behandlung ab 15. V.; am 9. VI., 6 Tage nach Beendigung der Behandlung, Parese des rechten N. facialis, rechten Armes, rechten Beines, am 1. VIII. nur noch geringe Reste der Paresen; am 13. IX. Befund annähernd normal; hat seit Jahren arteriosklerotische Beschwerden.

2. W., 21 Jahre alt, Polizeibeamter, am 12. III. 1925 von einem unbekannten Hund in den linken Mittelfinger gebissen; Behandlung vom 14. III. ab; am 30. III. Paraplegie beider Beine, Blasen- und Mastdarmlähmung; am 1. IV. Schlundkrämpfe; abends Exitus letalis. Im Gehirn wurde durch den Tierversuch Virus fixe nachgewiesen.

Über den 3., ebenfalls tödlich verlaufenen Fall soll später eingehend berichtet werden; hier sei nur erwähnt, daß in dem Gehirn, ebenso wie in dem 2. Fall, Virus fixe nachgewiesen wurde.

Wie aus den in der Tab. 6 zusammengestellten Zahlen hervorgeht, hat die Häufigkeit der Impflähmungen gegenüber der Behandlung nach *Pasteur* von 0,38 auf 0,17% abgenommen. Bedauerlicherweise haben aber 2 Fälle einen tödlichen Ausgang gehabt, so daß der Prozentsatz der tödlich verlaufenen Fälle von 0,016 auf 0,11% (auf die Gesamtzahl der Patienten bezogen) angestiegen ist. Auf die beachtenswerte Tatsache, daß auch an anderen Instituten neuerdings die letalen Fälle zugenommen haben, komme ich in Abschnitt VI zurück.

In den auswärtigen Behandlungsstellen sind bis zum 31. XII. 1925 insgesamt 2289 Patienten mit von uns abgegebenem Impfstoff behandelt worden (vgl. die Tab. 7 und 8).

Aus der Behandlungsstelle Würzburg ist uns folgender Fall berichtet worden.

H., 32 Jahre alt, Arbeiter, am 2. VIII. 1925 von einem tollen Hund (A) am linken Oberschenkel durch die Hose gebissen; Behandlung vom 2. VIII. ab; am 30. VIII. Unruhe, leichte Nackenstarre, Fieber, später Lähmung des rechten Beines; nach 3 Wochen krankhafte Erscheinungen zurückgegangen.

Ferner ist noch der in der vorstehenden Arbeit (dieses Heft S. 36) von *Knack*[6]) aus der Hamburger Behandlungsstelle mitgeteilte und von dem Autor als atypische Lyssa aufgefaßte Fall anzuführen.

Es handelt sich um einen von einem tollen Hunde (A) im Gesicht gebissenen Patienten, der am 17. Behandlungstage, 20 Tage nach der Verletzung, zunächst unter unbestimmten Symptomen erkrankte und nach 3 Tagen ein Krankheitsbild bot, das eine gewisse Mittelstellung zwischen schwerer Impflähmung und Lyssa einnahm. Die Sektion ergab schwere Myeloencephalitis mit völliger Erweichung des Lendenmarkes; durch Verimpfung von Gehirn auf Kaninchen und Meerschweinchen wurde ein Virus von 14—22tägiger Inkubationszeit (bei intramuskulärer Impfung an Kaninchen), bei den gestorbenen Tieren Negrische Körperchen nachgewiesen.

Ob es sich bei diesem Fall um eine durch die Behandlung modifizierte Lyssa gehandelt hat, oder ob er, wie es mir wahrscheinlich ist, der Gruppe der schweren Impflähmungen zuzurechnen ist, läßt sich nicht mit völliger Sicherheit entscheiden. Daß das Virus fixe außer Lähmungen auch Schlundkrämpfe hervorrufen kann, steht heute wohl fest (vgl. auch die von *Papamarku* zitierten Beobachtungen von *Athias* und *Imredy*). Wie weiter unten ausgeführt werden wird, läßt sich aus dem Nachweis eines Virus von 14—22tägiger Inkubationszeit nicht der Schluß ziehen, daß es sich nicht um ein Passagevirus gehandelt haben kann. Im vorliegenden Falle kommt noch hinzu, daß die Verimpfungen nicht subdural, sondern intramuskulär vorgenommen wurden. Daß die Differentialdiagnose zwischen Impflähmung und Lyssa manchmal erhebliche Schwierigkeiten bereiten kann, geht auch aus einem von *Papamarku* (S. 100) eingehend mitgeteilten Fall hervor. In unseren Tabellen haben wir den Hamburger Fall als tödliche Impflähmung geführt.

Zur Orientierung gebe ich nachstehend eine Zusammenstellung sämtlicher Todesfälle, sowohl an Lyssa wie an Impflähmung, bei den nach *Pasteur* und den nach *Högyes-Phillips* Behandelten.

Tabelle 8a.

Behandlungsmethode	Anzahl d. Behandelten	Todesfälle an Lyssa	Todesfälle an Impflähmung	Gesamte Todesfälle
Pasteur 1. IV. 1914 bis November 1923. . . .	6086	28 = 0,46%	1 = 0,016%	29 = 0,476%
Högyes-Phillips November 1923 bis 31. XII. 1925.	4063	4*) = 0,1%	3 = 0,075%	7 = 0,175%

*) Diese Zahl ist noch nicht endgültig, da für die 843 nach dem 1. IV. 1925 Behandelten die Beobachtungszeit noch nicht abgelaufen ist; bisher ist kein Todesfall vorgekommen. Die bisher bei der Högyes-Phillips-Methode vorgekommenen Lyssatodesfälle sind alle vor dem 14. Tag nach Abschluß der Behandlung eingetreten.

Die Verluste an Menschenleben sind, wie die Tabelle zeigt, seit Einführung des neuen Behandlungsverfahrens weit geringer als früher. Natürlich haben wir aber die Pflicht, alles zu tun, um die schweren Fälle von Lähmung zu vermeiden, wenn möglich, ohne dabei die

Wirksamkeit der Schutzimpfung zu beeinträchtigen. Nun bleibt unsere Dosierung des frischen Gehirns weit unter der an anderen Instituten üblichen (vgl. unten). *Phillips* läßt allerdings der Behandlung mit lebendem Impfstoff zunächst eine solche mit totem Material vorangehen, alle übrigen Institute fangen aber wie wir mit lebendem Virus an. Wir haben daher zunächst nur das Virus gewechselt und sind im Oktober 1925 dazu übergegangen, bei der Herstellung des Impfstoffes an Stelle der Stämme „Breslau" und „Budapest" wieder unser für Kaninchen weniger virulentes Berliner Passagevirus zu verwenden.

VI. Über die Entstehungsweise der Impflähmungen.

Wir sind im II. Abschnitt dieser Arbeit zu der Schlußfolgerung gelangt, daß die Impflähmungen zum mindesten ihrer überwiegenden Mehrzahl nach als Folge der Behandlung aufzufassen sind, und daß dementsprechend ihre Häufigkeit und ihre Schwere von der Art der Behandlung abhängt. Das ist, wie *Papamarku* betont hat, die Frage, um die es sich in der Praxis handelt.

Was nun die weitere theoretische Frage nach der speziellen Entstehungsweise der genannten Erkrankungen angeht, so sprechen die in der Tab. 3 mitgeteilten Zahlen entschieden gegen die Möglichkeit, daß sie auf einer Art von anaphylaktischer Reaktion auf die artfremden Nervensubstanzen beruhen könnten. Die dort aufgeführten Patienten haben alle etwa dieselbe Menge von artfremdem Eiweiß erhalten und, da die art- und organspezifischen Eigenschaften des Organeiweißes durch Trocknung erfahrungsgemäß wenig beeinflußt werden, so ist die auffallende Häufigkeitsabstufung von 0,89 auf 0,32 und 0,19% bei den einzelnen Behandlungsgruppen zum mindesten hierdurch allein nicht zu erklären.

Weit schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob und in welcher Häufigkeit etwa primär giftig wirkende Stoffe der Zentralnervensubstanz des Lyssainfizierten oder auch des normalen Kaninchens für die Entstehung der Lähmungen von ursächlicher Bedeutung sind. Bekanntlich hat *Babes*[13]) mit Filtraten vom Zentralnervensystem lyssakranker Tiere bei Tieren Vergiftungs- und Degenerationserscheinungen, welche sich im Nervensystem abspielten, hervorrufen können. Er hält es für wahrscheinlich, daß die hier in Frage stehenden Lähmungen durch spezifische Gifte des Virus verursacht werden, eine Ansicht, welche auch von *Remlinger*[14]) vertreten worden ist. Nach *Marie*[15]) vermag aber schon die normale Nervensubstanz bei wiederholter parenteraler Einverleibung toxische Wirkung auszuüben. Auch *Kraus* und *Grosz*[4]) konnten aus normalen Kaninchengehirnen Extrakte gewinnen, welche sich für Kaninchen als giftig erwiesen. Welcher Art diese Vergiftungen waren, worauf es schließlich am meisten ankommt,

ist aber nicht angegeben. *Kraus* hält es für wahrscheinlich, daß der frischen, kurz getrockneten Nervensubstanz eine höhere Toxizität eigen ist, als der längere Zeit bei 22° getrockneten, kann aber zur Begründung letzten Endes nur die Tatsache anführen, um deren Erklärung es sich handelt: daß bei weniger intensiver Behandlung viel seltener Paralysen vorkommen.

Schweinburg[5]) hat nun neuerdings über Versuche berichtet, in welchen es gelungen ist, bei Kaninchen vermittels subcutaner Vorbehandlung mit wechselnden Mengen von getrocknetem oder frischem normalem menschlichen Rückenmark in einem erheblichen Prozentsatz der Fälle Erkrankungen hervorzurufen, welche sich im wesentlichen in Lähmung der Extremitäten- und Körpermuskulatur äußerte und nicht selten zum Tode der Tiere führte. Wie aus der ausführlichen Arbeit von *Koritschoner* und *Schweinburg*[5]) zu ersehen ist, steht das Erkrankungsbild manchen Fällen von Impflähmung beim Menschen in symptomatischer Hinsicht recht nahe, und das gleiche gilt von den anatomischen und histologischen Befunden am Zentralnervensystem. Die Markmengen, welche den Kaninchen eingespritzt wurden, sind allerdings relativ zum Körpergewicht recht beträchtlich gewesen, etwa 2—7 mal so groß wie bei der Wutschutzbehandlung nach *Pasteur*.

Durch diese Versuche hat die Auffassung von *Marie* zweifellos eine beachtliche experimentelle Grundlage erhalten, wenngleich man nicht außer acht lassen darf, daß *Babes*[13]) in mehreren hundert Fällen von Injektionen großer Mengen normaler Nervensubstanz zu therapeutischen Zwecken in keinem Fall derartige Paralysen auftreten sah.

Aber auch die Tatsache, daß bei der Behandlung nach *Puscariu* mit auf 50—80° erhitzten, also — wie man wohl annehmen darf — abgetöteter Rückenmarksemulsion Impflähmungen oft vorkamen (1 : 303; zit. nach *Kraus*) spricht dafür, daß neben der Quantität des lebenden Virus auch Giftstoffe bei der Entstehung der Lähmungen beteiligt sein können. *Babes*[13]) berichtet über einen Fall von Impflähmung nach alleiniger Behandlung mit auf über 70° erhitztem Rückenmark, in welchem der Hund, der gebissen hatte, nicht tollwutkrank war.

Nach *Alivisatos*[16]) kann man relativ große Mengen von Virus fixe ohne jede Gefahr einspritzen, wenn das Passagegehirn einer 72—84-stündigen Vorbehandlung mit Äther unterzogen wird. Bei 989 Patienten (darunter 315 mit schweren Bißverletzungen) denen *Alivisatos* neben einer Behandlung nach einer verstärkten Högyes-Methode in den ersten Tagen 8—10 g Äthergehirn einspritzte, kamen weder Erkrankungen an Tollwut, noch Impflähmungen vor.

Hempt[17]) ist insofern einen Schritt weitergegangen, als er die Behandlung nach *Högyes* beiseite läßt und nur noch Äthergehirn, je nach der Schwere des Falles, während 4—6 Tagen 1—4 g, einspritzt. Bei

6653 nach dieser verkürzten Methode behandelten Patienten sind nur 4 Todesfälle an Lyssa während oder vor Ablauf von 14 Tagen nach der Behandlung, und keine Impflähmung vorgekommen. Nach einer früheren Mitteilung von *Remlinger*[18]) tritt bei einem in Äther eingelegten Passagegehirn ein von außen nach innen schichtweise fortschreitender Verlust der Infektiosität für Kaninchen ein, der die innersten Partien erst nach 5 Tagen erreicht. Das Wesentliche der Alivisatos-Methode dürfte demnach in Übereinstimmung mit *Hempt* in der Applikation einer großen Menge eines in seiner Virulenz abgeschwächten Passagevirus zu suchen sein.

Gegen die Annahme, daß Giftstoffe die alleinige Ursache der Lähmungen sind, sprechen gewichtige Tatsachen. Einmal ist an einem großen Material von *Papamarku, v. d. H. van Genderen* und uns immer wieder bestätigt worden, daß die Lähmungen bei der Behandlung mit getrocknetem Mark nach *Pasteur* um so häufiger sind (und nach unseren Erfahrungen um so eher schwer oder gar tödlich auslaufen), je frischer das Mark ist. Hier wechselt die Menge der lebenden Erreger, während die Quantität der Marksubstanz die gleiche bleibt. Daß die Giftwirkung des normalen Markes mit zunehmender Trocknungsdauer abnehmen sollte, ist an sich schon wenig wahrscheinlich. Dagegen sprechen auch die Tierversuche von *Schweinburg*, in denen das länger getrocknete Mark sogar eher stärker wirkte.

Zweitens kommen Impflähmungen der gleichen Art wie nach der Behandlung nach *Pasteur* auch bei der Högyesschen Methode vor, trotzdem hier doch ganz erheblich geringere Mengen von Nervensubstanz eingespritzt werden. Bei der von uns befolgten Dosierung erhält der Patient im ganzen 90 mg eingespritzt, anstatt wie früher etwa 1335 mg. Auch die in Abschnitt II besprochenen leichteren nervösen Störungen während und nach der Behandlung sind seit der Einführung der neuen Methode nicht seltener geworden, wie doch zu erwarten wäre, wenn es sich, im Sinne von *Schweinburg*, um Giftwirkungen der Nervensubstanz handelte.

Schließlich scheinen uns aber die bereits von *Papamarku* eingehend besprochenen Fälle von *Bareggi*, die 3 von *v. d. H. van Genderen* mitgeteilten und die 2 von uns beobachteten, bei denen im Gehirn der Gestorbenen Virus fixe nachgewiesen wurde, für die ursächliche Bedeutung dieses Virus im Sinne einer Passagevirusinfektion zu sprechen.

Nun verweist man demgegenüber auf die bekannten Beobachtungen von *Paltauf*[19]), der in dem Gehirn von 4 an *interkurrenten* Krankheiten gestorbenen Wutschutzpatienten durch Verimpfung auf Kaninchen ein Virus nachgewiesen hat, bei dem es sich nach der Ansicht des Autors um ein Straßenvirus, jedenfalls aber um ein Virus von geringer Virulenz

gehandelt hat. Aus dem Breslauer Institut berichtet *Quast*[20]) neuerdings über einen Patienten, der wegen des Verdachtes einer Kontaktinfektion durch einen tollen Hund in Behandlung genommen wurde und nach der 15. Injektion unter Kopfschmerzen, Magenbeschwerden und Erbrechen erkrankte und nach 3 Tagen unter dem klinischen Bilde einer Meningitis starb. Die Sektion ergab als wichtigste Befunde progrediente Lungentuberkulose mit Arrosion einer Vene und tuberkulöse Meningitis. Im Gehirn wurde durch Verimpfung auf Kaninchen ein Virus von der Inkubationszeit des Passagevirus, das offenbar in hoher Konzentration vorlag, nachgewiesen.

Bei diesen Fällen kommt naturgemäß alles darauf an, ob die Patienten, bei denen das Virus nachgewiesen wurde, auch tatsächlich an einer interkurrenten Krankheit, ohne jede Beteiligung einer Infektion durch Wutvirus (Straßen- oder Passagewut) gestorben sind. Diese Frage ist um so angebrachter, als es sich in 4 von den 5 Fällen bei der interkurrenten Erkrankung um eine Erkrankung des Gehirns handelt, und die Differentialdiagnose der Lyssa von anderen stürmisch verlaufenden Erkrankungen des Zentralnervensystems manchmal erhebliche Schwierigkeiten bereiten kann. Die kurzen Angaben von *Paltauf* lassen manches vermissen, was zur Bildung eines selbständigen Urteils über die Berechtigung der Diagnosen: Delirium tremens (2 Fälle), Encephalomalacie (1 Fall) nicht zu entbehren ist. Bei dem mit ausführlicher Krankengeschichte und Sektionsprotokoll versehenen Bericht aus Breslau kann man sich jedoch dem Eindruck, daß der Patient, in dessen Gehirn Virus fixe nachgewiesen wurde, tatsächlich an Meningitis, also interkurrent, erkrankt und gestorben ist, nicht entziehen.

Das Auftreten von akuter tbc. Meningitis während der Wutschutzbehandlung ist bereits früher in einem Fall von *Carnot* und *Gardin* [zit. nach *Remlinger*[21])] beobachtet worden und wurde von den Autoren in dem Sinne einer Aktivierung einer bestehenden Tuberkulose durch die Impfung aufgefaßt. Eine Untersuchung des Gehirns auf Virus scheint nicht stattgefunden zu haben. Bei dem S. 170 mitgeteilten Fall W. wurde bei der Sektion frische Aussaat von Tuberkeln auf dem Peritoneum festgestellt. Angesichts dieser 3 Fälle muß man sich doch fragen, ob *Knack* im Recht ist, wenn er meint, daß es sich bei der Beobachtung von *Carbot* und *Gardin* vielleicht lediglich um ein zeitliches Zusammentreffen und nicht um eine Exacerbation der Tuberkulose gehandelt hat.

Quast wirft die Frage auf, ob die Meningitis das Gehirn zu einem Locus resistentiae minoris gemacht habe, so daß das Virus fixe besser haften konnte. Diese Frage ist durchaus berechtigt und kann auch bei den 3 besprochenen Fällen von *Paltauf*, bei denen die lange Inkubationszeit des nachgewiesenen Virus ja nicht unbedingt gegen Passagevirus spricht, erhoben werden. Ist es doch gut denkbar, daß das Virus sich in einem pathologisch veränderten Gehirn ansiedeln und vermehren könnte, während es im gesunden rasch zugrunde geht.

Diese Möglichkeit schien mir besonders in dem Fall von *Paltauf*, in dem der Tod infolge eines apoplektischen Insultes eintrat, gegeben zu sein. Ich habe daher bereits vor längerer Zeit folgende Tierversuche angestellt.

3 Kaninchen erhielten je eine intravenöse Injektion von einer Emulsion von frischem Passagegehirn, und zwar je 0,05—0,1 g Virus fixe „Breslau“ bzw. „Budapest“. Die 3 Tiere blieben während 30, 18 bzw. 29 Tagen o. B. und wurden dann (gesund) zu anderen Versuchen benutzt. Ebenso wurden 3 andere Kaninchen behandelt, nur wurden sie nach der intravenösen Injektion trepaniert und mit einer rechtwinklig gebogenen Nadel dieselbe Manipulation vorgenommen wie bei der subduralen Passageimpfung, jedoch mit leerer steriler Nadel; es wurde also eine leichte Verletzung der Dura und auch wohl der Pia mater und der Gehirnoberfläche gesetzt. Eines dieser Tiere, das mit Virus „Breslau“ intravenös infiziert war, erkrankte nach 7 Tagen an typischer Passagewut und starb nach 10 Tagen.

Der Versuch spricht für eine Begünstigung der Infektion durch eine lokale Blutung und Gewebszertrümmerung, ist aber natürlich wegen der geringen Zahl der Versuchs- und Kontrolltiere nicht beweisend.

Ich habe dann ferner einige Versuche darüber angestellt, ob sich bei Hunden und Kaninchen, die mit reichlichen Dosen Virus fixe subcutan vorbehandelt und nach einiger Zeit, während sie noch gesund waren, getötet wurden, im Gehirn das Passagevirus nachweisen ließ.

1. Hund, ca. 3500 g, erhält vom 7. IV. bis 25. IV. 1924 in 10 Sitzungen insgesamt 60 mg Virus fixe (3 Stämme) subcutan eingespritzt; am 29. IV. Befinden o. B.; Tötung; mit Emulsion von Gehirn und Rückenmark (reichliche Menge) 1 Kaninchen subdural und 1 Meerschweinchen intramuskulär geimpft; bleiben bis zum Abschluß (Anfang September) gesund.

2. Kaninchen erhält vom 31. VII. bis 2. VIII. 1924 in 3 Sitzungen insgesamt 210 mg Virus fixe (Stamm „Budapest“) subcutan eingespritzt; am 7. VIII., bisher o. B., etwas schwach im Kreuz; am 8. VIII. völlig o. B.; Tötung; mit Emulsion von Gehirn- und Lendenmark 1 Kaninchen subdural geimpft; bleibt bis zum Abschluß (25. XI.) gesund.

Quast berichtet ebenfalls über derartige Versuche. Er konnte bei 3 Hunden, die mit Virus fixe, in den Dosen der Wutschutzbehandlung beim Menschen, subcutan vorbehandelt waren, in 2 Fällen im Gehirn Passagevirus nachweisen. Dieser Nachweis gelang aber nur bei den Hunden, die am letzten Behandlungstage getötet wurden. Bei dem 3. Tiere, bei dem die Tötung erst 2 Tage später erfolgte, fiel die Verimpfung zweifelhaft aus, indem zwar 1 Tier uncharakteristisch erkrankte, die Weiterverimpfung seines Gehirns aber negativ ausfiel.

Dieser letztere Befund erscheint mir im Zusammenhang mit der Tatsache, daß in meinen Versuchen bei den erst 4 bzw. 6 Tage nach der letzten Impfung getöteten Tieren kein Virus nachgewiesen wurde, wesentlich. Das Virus ist zwar kurze Zeit nach der letzten Injektion nachzuweisen, scheint aber in der Regel rasch zugrunde zu gehen. *Quast* betont auch, daß die Verimpfungen nur bei Übertragung eines reichlichen Quantums Gehirn positiv ausfielen; mit dünner Emulsion geimpfte Kaninchen blieben gesund.

Die Ergebnisse der besprochenen Versuche erinnern in mancher Hinsicht an die neuerdings von *Rose* und *Walthard*[23]) mitgeteilten Befunde bei der experimentellen Herpesinfektion des Meerschweinchens.

An eine erfolgreiche Sohleninfektion schließt sich hier mit großer Regelmäßigkeit eine Myelitis des Lumbosakralmarkes an, die sich in nervösen Ausfallserscheinungen kundgibt und starke Tendenz zur Ausheilung zeigt. Das Virus breitet sich nach der Annahme der Autoren in den sensiblen Fasern des Nervus ischiadicus aus, über die es in das Rückenmark eintritt und hier entzündliche Veränderungen hervorruft. Grundsätzlich die gleichen, wenn auch weniger schwere und ausgedehnte myelitischen Prozesse wurden in einigen Fällen festgestellt, in denen bei den Meerschweinchen nach angegangener Sohleninfektion keinerlei Symptome einer Erkrankung des Zentralnervensystems festzustellen waren. Im Rückenmark der erkrankten Meerschweinchen ließ sich durch cutane und plantare Verimpfung das Virus nachweisen, aber nur dann, wenn die Tiere beim ersten Auftreten der Lähmungen getötet wurden. Das Virus geht also offenbar rasch zugrunde. Damit stimmt überein, daß sich in dem Gehirn von Meerschweinchen, die nach Plantarinfektion an akuter Encephalitis eingegangen waren, bisweilen selbst unter Zuhilfenahme der subduralen Verimpfung auf das empfindliche Kaninchen kein Virus nachweisen läßt. *Das letztere ist deshalb von Interesse, weil wir grundsätzlich wohl die gleiche Erscheinung vor uns haben, wenn sich in dem Gehirn von an Impflähmung gestorbenen Menschen durch den Tierversuch das Virus fixe nicht mehr nachweisen läßt.* In beiden Fällen handelt es sich um eine Infektion mit einem Virus, das sich in dem betreffenden Organismus zwar vermehren kann und unter Umständen imstande ist, irreparable tödliche Veränderungen im Zentralnervensystem hervorzurufen, trotzdem aber dem Organismus offenbar wenig angepaßt ist und deshalb in der Regel bald zugrunde geht. Die im Gegensatz zu dem Verhalten des Kaninchens erheblich größere Widerstandsfähigkeit des Meerschweinchengehirns und -rückenmarks gegenüber dem Herpesvirus geht aus dem Umstande hervor, daß die subdurale Infektion nicht mit Regelmäßigkeit angeht und nach cornealer Impfung bisher noch kein Fall von tödlicher Encephalitis beobachtet worden ist.

Wieweit die Resultate von *Quast* auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen werden können, ist schwer zu sagen. Auf jeden Fall lassen sie es möglich erscheinen, daß das Passagevirus auch im menschlichen Gehirn nicht so schnell abgetötet wird, daß es nicht bei zufälligem Tod während der Wutschutzbehandlung in vielen Fällen nachweisbar bliebe. Seine Erhaltung und Vermehrung wird wahrscheinlich durch pathologische Veränderungen im Gehirn begünstigt. Ob auch gewisse andere Infektionen, auch wenn sie zunächst nicht das Gehirn betreffen, eine begünstigende Rolle spielen können, woran man angesichts der höchst auffälligen Tatsache denken könnte, daß der Nachweis in 2 Fällen gelang, in denen gleichzeitig frische tuberkulöse Prozesse festgestellt wurden, bleibe dahingestellt. Andererseits ist es nicht auszuschließen, daß das Virus fixe eine latente Infektion mit einem anderen Erreger aktiviert (s. o.).

Vielleicht gilt dasselbe für Straßenwut. Bei einem während des Krieges aus einem auswärtigen Krankenhaus eingesandten Gehirn

wurde Lyssa festgestellt (Negri positiv), während der Sektionsbefund tuberkulöse Meningitis ergeben hatte. Eine Wutschutzbehandlung hatte nicht stattgefunden. In diesem bemerkenswerten Fall bleibt es zweifelhaft, in welchem Maße sich die beiden Krankheitserreger gegenseitig aktiviert oder begünstigt hatten und welcher als letzte Ursache des Todes anzusehen war. Der Befund von Negrischen Körperchen beweist jedenfalls, daß es sich nicht lediglich um eine Verschleppung von Straßenwutvirus ins Gehirn gehandelt hat.

Hiernach läßt sich der Nachweis von Passagevirus in dem Gehirn für sich allein nicht unbedingt in dem Sinne einer echten Infektion mit diesem Virus deuten. Andererseits halten wir es aber gleichwohl für sicher, daß es sich bei den erwähnten Fällen von *Barregi*, *v. d. H. van Genderen* und unserer Station, bei denen sich das Virus fixe offenbar in hoher Konzentration und maximaler Virulenz eine Reihe von Tagen nach der letzten Einspritzung im Gehirn fand, während für irgendeine andere Erkrankung kein Anhaltspunkt vorlag, um Virus fixe-Infektionen gehandelt hat. Schon von vornherein ist es wahrscheinlich, daß das Passagevirus, welches doch schließlich nur ein in seiner Virulenz modifiziertes Lyssavirus ist, gelegentlich beim Menschen zu Infektionen führen kann. Dann steht aber auch gerade bei den in kurzer Zeit tödlich verlaufenden Fällen von Impflähmung das klinische Bild demjenigen der echten Lyssa manchmal so nahe, daß über die verwandte Natur beider Erkrankungen und die infektiöse Genese solcher Impflähmungen kaum ein Zweifel bestehen kann.

Wenn man auf diesem Standpunkt steht, ist es nicht überraschend, daß wir gelegentlich Fällen begegnen, deren Symptomenbild sozusagen in der Mitte zwischen typischer Impflähmung und echter Tollwut steht, und bei denen eine Entscheidung über ihre Entstehung schwer ist. Auch die Verimpfung von Gehirn auf Kaninchen bringt hier nicht immer Klarheit, weil das für den Menschen nicht hochvirulente Kaninchenvirus, auch wenn es nach Einverleibung größerer Mengen bei der Wutschutzimpfung gelegentlich zu tödlicher Erkrankung führt, im menschlichen Gehirn — ebenso wie das Herpesvirus beim Meerschweinchen und das Hühnerpestvirus bei den wenig empfänglichen Gänsen (*Kleine*) — offenbar häufig bald wieder abstirbt, wobei es vermutlich vorher ein Stadium abgeschwächter Virulenz durchmacht. *Daher darf man bei einem negativen Ausfall der Tierversuche oder bei dem Befund eines Virus von längerer Inkubationszeit* (wie in dem von *Knack* mitgeteilten Fall) *eine Erkrankung durch Virus fixe nicht ausschließen.*

Bekanntlich ist nun geltend gemacht worden, es sei doch unwahrscheinlich, daß das Virus fixe, das von Tausenden von Menschen ohne sichtbare Schädigung vertragen wird und in einzelnen Fällen auch absichtlich im frischen Zustand in großen Mengen ohne Schaden einge-

spritzt worden ist, plötzlich bei einzelnen Personen zu schweren Infektionen führen sollte. Dem ist entgegenzuhalten, daß auch das Kuhpockenvirus unter vielen Millionen von Impfungen nur bei ganz wenigen besonders disponierten Kindern zu schweren und ausnahmsweise sogar zu tödlichen Generalisationen führt.

Auf die Analogie mit der Paralyse und der Tabes ist bereits oben (S. 158) hingewiesen worden. Auch hier könnte man auf Grund von vielen Hunderten von Beobachtungen bei Nichtdisponierten, wie Naturvölkern, zu der Ansicht kommen, das Virus der Syphilis sei nicht imstande, das Zentralnervensystem zu infizieren.

Die erschreckende Häufung der schweren Erkrankungen bei *Bareggi* läßt wohl keinen Zweifel übrig, daß eine so intensive Behandlung, wie er sie geübt hat, zum mindesten bei Kindern im hohen Grade lebensgefährlich ist. Wenn *Koritschoner* und *Schweinburg*[5]) demgegenüber bemerken, daß *Ferran* nach der gleichen Methode zahlreiche Personen ohne Schaden behandelt habe, so weise ich auf die in der Arbeit von *Papamarku*[1]) (S. 98) gegebene Aufklärung des historischen Sachverhaltes hin. *Ferran* hat selbst angegeben, seine Methode sei „mit einem Mangel behaftet gewesen . . .“; aus diesem Grunde habe er später der Emulsion Quecksilberalbuminat zugefügt und nach *dieser Änderung* sei die Methode unschädlich geblieben; *die Fälle von Bareggi hätten aber einer Zeit angehört, zu welcher die Impfung nicht unschädlich war.*

Höchst auffallend ist, daß sowohl bei unserer neuen Methode als auch bei *v. d. H. van Genderen* die schweren Fälle überwiegen. Von den 10 Impflähmungen, welche in Weltevreden seit der Einführung der Högyesschen Methode beobachtet wurden, nehmen 4 (= 40%) einen tödlichen Ausgang. Man kann daran denken, daß das bei dieser Methode verwandte ganz frische Virus, möglicherweise auch durch die gegenüber dem getrockneten Mark entschieden feinere Emulgierung des frischen Passagegehirns begünstigt, verhältnismäßig häufig zu den schwersten Formen der Impflähmung führt. Auch der erste Fall, der in Budapest bei der Högyes-Methode beobachtet wurde, verlief sehr schwer (*v. Imredy*, 1909; zit. nach *Simon*): Fieber, aufsteigende Lähmung der Beine, Blase, Rumpf, Arme, Schlingmuskulatur; nach 20 Tagen Rückgang der Lähmungen.

Bemerkenswert ist die große Seltenheit der Impflähmungen im Budapester Institut. Unter 45 477 nach den Originalschemata von *Högyes* Behandelten kamen nur 2 Fälle vor (zit. nach *Simon*). Jetzt beträgt die Gesamtdosis für Erwachsene, wie wir aus einer freundlichen Mitteilung von Herrn Prof. *Szekeli* entnehmen, 237,5 mg Passagegehirn. Lähmungen sind aber trotz dieser relativ hohen Dosis nicht beobachtet worden.

Andererseits sah *Schweinburg*[5]) auch bei Behandlung nach *Pasteur* relativ viele schwere Fälle: unter 39 (bei 14 396 Patienten) 8 = 23% tödlich verlaufende. Die in Wien angewandten Schemata sind im Vergleich mit den unsrigen, die wir von 1904 bis 1923 benutzt haben, als milde zu bezeichnen: 5—2tägiges Mark, wobei 2—5mal 2tägiges als frischestes gegeben wurde. Dabei ist die Gesamtmenge des eingespritzten Markes ungefähr ebenso groß gewesen (nämlich je nach dem Schema etwa 6,25, 8,75, 13,0, 6,5, 7,0 cm Mark) wie bei uns (ca. 8,4 cm). Wir haben aber in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle 1tägiges Mark gegeben, zeitweise sogar an 10—11 Tagen (vgl. Tab. 1). Bei dieser Sachlage ist der beträchtliche Unterschied in der Mortalität der in beiden Instituten im ganzen etwa gleich häufig aufgetretenen Impflähmungen doch recht auffallend: in Wien 23%, in Berlin 7% Todesfälle unter den Impflähmungen bei der Behandlung nach *Pasteur*.

Von Interesse ist auch der Umstand, daß die Lähmungsfälle in Wien erst von 1915 ab, nachdem von 1897 ab bereits 6814 Impfungen ausgeführt worden waren, aufgetreten sind, und zwar anscheinend, ohne daß irgendeine Änderung in der Behandlung stattgefunden hatte.

Wahrscheinlich ist neben der Menge der einverleibten lebenden Erreger und neben den von Marie, Babes, Schweinburg und anderen angenommenen Giftstoffen doch auch die Besonderheit der einzelnen Virus fixe-Stämme für das Auftreten und den Verlauf der Impflähmungen von Bedeutung. Ob auch Virulenzschwankungen *eines und desselben Stammes* im Sinne einer erhöhten Infektiosität für den Menschen vorkommen, woran man bei dem unvermittelten Auftreten der Impflähmungen in Wien denken könnte, ist nicht bekannt. Bezüglich der Lähmungsfälle unter unseren nach *Högyes* Behandelten sei daran erinnert, daß wir seit Anfang 1924, also kurz nach der Einführung der neuen Methode, auch das Passagevirus gewechselt haben. Wie bereits erwähnt, verwenden wir seit kurzem wieder den für Kaninchen schwach virulenten Stamm „Berlin“.

VII. Allgemeine Ergebnisse.

Von 4399 Patienten, die in der Berliner Station vom 1. IV. 1917 bis November 1923 nach der verstärkten Methode von *Pasteur*, aber je nach der Gefährlichkeit der Bißverletzung verschieden intensiv behandelt wurden, starben insgesamt 20 = 0,45% an Lyssa. Die reduzierte Mortalität betrug 0,14%. Bei einem Vergleich mit früheren Perioden, in denen entweder intensiver oder schwächer behandelt worden war, ergab sich kein deutlicher Unterschied zugunsten einer intensiveren Behandlung. Dagegen ergab eine Vergleichung größerer Zeiträume, daß seit dem Bestehen der Station die Mortalität an Lyssa unter den Behandelten unabhängig von der Behandlungsintensität

nicht unerheblich abgenommen hat. Eine ähnliche Abnahme lassen die vom Pariser Institut mitgeteilten Zahlen erkennen.

Unter 6086 vom 1. IV. 1914 bis November 1923 nach verschieden intensiven Pasteurschen Methoden behandelten Patienten sind insgesamt 23 = 0,38% an Impflähmung erkrankt und davon 1 gestorben. Aus der Verteilung dieser Zufälle ergibt sich in Bestätigung der Beobachtungen von *Papamarku*, daß sie um so häufiger auftraten, je intensiver die Behandlung war; andererseits spielt bei ihrer Entstehung eine durch geistige Arbeit bzw. Überanstrengung geförderte Disposition eine wesentliche Rolle. Zum mindesten die Mehrzahl dieser Zufälle ist unserer Ansicht nach auf die Behandlung zurückzuführen.

Im November 1923 wurde in unserer Station die Behandlungsmethode von *Högyes* mit der Modifikation von *Phillips* eingeführt. Nach dieser Methode sind von uns bis zum 31. III. 1925 1376 Patienten behandelt worden, von denen 3 = 0,22% an Lyssa gestorben sind; die reduzierte Mortalität betrug 0. Außerdem wurden während des gleichen Zeitraums mit von uns abgegebenem Impfstoff an auswärtigen Behandlungsstellen 1844 Patienten behandelt; von diesen ist 1 an Lyssa gestorben (= 0,05%; reduzierte Mortalität = 0). Zusammen kamen mithin unter 3320 nach diesem Verfahren Behandelten 4 = 0,12% Todesfälle an Lyssa vor, davon keiner später als 14 Tage nach Abschluß der Behandlung.

Von Impflähmungen sind unter 1774 in Berlin bis zum 31. XII. 1925 nach dieser Methode Behandelten 3 Fälle (0,17%), davon 2 tödlich verlaufene (0,11%) vorgekommen. Unter den 2289 in derselben Weise auswärts Behandelten ist uns 1 Fall von mittelschwerer Paraplegie berichtet worden, ferner der von *Knack* veröffentlichte, von ihm als atypische Lyssa aufgefaßte Todesfall. Die Häufigkeit dieser Zufälle hat also gegenüber dem früheren Pasteurschen Verfahren beträchtlich abgenommen. Sie sind aber im Durchschnitt schwererer Natur. Während bei der Pasteurschen Methode seit 1914 unter 23 Impflähmungen nur 1 Fall und seit Bestehen der Station unter 27 Lähmungen 2 Fälle tödlich verlaufen sind, sind von den 3 in Berlin nach der Högyes-Methode beobachteten Lähmungserkrankungen 2 und von den beiden an auswärtigen Behandlungsstellen beobachteten 1 Fall gestorben.

Die Entstehung der Impflähmungen ist noch nicht völlig geklärt. Vorläufig dürfte die Auffassung, daß es sich zum mindesten bei der überwiegenden Mehrzahl um Virus fixe-Infektionen handelt, der Gesamtheit der bekannten Tatsachen am ehesten gerecht werden. Möglicherweise spielen aber auch Giftwirkungen durch die artfremde normale oder infizierte Nervensubstanz eine gewisse Rolle. Die Häufig-

keit und Schwere der Impfzufälle in den einzelnen Instituten hängt offenbar zum Teil aber auch von Besonderheiten der verwandten Virus fixe-Stämme ab. Dasselbe dürfte auch für die Erfolge bezüglich der Verhütung der Lyssa gelten.

Die Beurteilung dieser praktisch so bedeutungsvollen Fragen wird dadurch erheblich erschwert, daß von den meisten Instituten keine regelmäßigen, von manchen überhaupt keine Berichte über die unter den Behandelten aufgetretenen Erkrankungen vorliegen. Die jeweils benutzten Methoden sind lange nicht von allen Instituten bekannt; etwaige Änderungen der Behandlung werden in der Regel nur gelegentlich mitgeteilt. Über die Virulenz der zur Behandlung benutzten Virus fixe-Stämme sind wir nicht genau unterrichtet. In Betracht kommen hierbei neben der Inkubationszeit bei der subduralen Passageimpfung die Feststellung der Dosis letalis minima für Kaninchen nach *Harris* und die Untersuchung der Infektiosität bei subcutaner Injektion nach *Fermi;* inwieweit die Ergebnisse dieser Methoden parallel gehen, bedarf noch erst der Untersuchung.

Auch die Berichterstattung über die typischen Lyssafälle ist nicht einheitlich; vielfach fehlt jede Angabe über das betreffende Tier (A, B, C nach *Pasteur*), den Sitz der Verletzung und die zeitlichen Umstände. Die Berichte über die Behandlungserfolge sollten in ähnlicher Weise wie das in den jährlichen Mitteilungen des Pariser Instituts und in der Arbeit von *Papamarku* geschehen ist, zum wenigsten den Anteil der A- + B-Fälle unter der Gesamtheit der Behandelten angeben, auch sollte zu erkennen sein, wie viele von den überlebenden Patienten wirklich gebissen und wie viele nur geleckt oder gekratzt worden sind. Unentbehrlich ist auch die Angabe, wie lange und in welcher Weise die Behandelten kontrolliert worden sind. In Deutschland besteht, abgesehen von einer sofortigen Anzeige jedes Todesfalles von Lyssa, die Vorschrift, daß die Kreisärzte 1 Jahr nach Abschluß der Behandlung sich davon zu überzeugen haben, ob der Behandelte lebt und gesund ist, und die Wutschutzstation von dem Befunde in Kenntnis setzen.

Infolge der unzulänglichen Berichterstattung sind die Wutschutzstationen mehr oder weniger auf ihre eigenen Erfahrungen angewiesen. Das ist um so bedauerlicher, als sich die Vorzüge und Nachteile einer Behandlungsmethode meistens erst nach längerer Zeit beurteilen lassen. Es erscheint uns daher mit *Joannovitch*[22]) dringend erwünscht, eine genaue Übersicht über die Erfahrungen in den verschiedenen Pasteur-Stationen zu erhalten. Als Mittel dazu käme unseres Erachtens zunächst eine internationale Umfrage seitens einer geeigneten Zentralstelle auf Grund eines zu vereinbarenden Fragebogens in Betracht.

Anhang.

Über den Versuch einer teilweisen Dezentralisierung der Wutschutzbehandlung.

Schon immer ist von unserer, wie auch wohl von anderen Stationen in vereinzelten Fällen, vor allem für Ärzte und Tierärzte, aber auch für andere Personen, bei denen eine Berufsstörung durchaus vermieden werden sollte, Impfstoff nach auswärts verschickt worden — in der Regel, nachdem die Betreffenden von uns untersucht waren. Die Gründe, welche das Institut im Jahre 1923 veranlaßten, versuchsweise in größerem Umfang eine Dezentralisation der Wutschutzbehandlung einzuführen, waren äußerer und dringlicher Natur. Die bekannten Schwierigkeiten der Inflationszeit machten vielen Patienten einen längeren Aufenthalt in Berlin geradezu unmöglich. Durch die Dezentralisierung wurde wenigstens einem Teil von ihnen Gelegenheit geboten, sich in der Heimat oder in der Nähe ihres Wohnortes der Behandlung zu unterziehen. Diese Maßnahme wurde aber von Anfang an als eine vorübergehende und als ein Versuch angesehen.

Wenn neuerdings von einigen Autoren empfohlen wird, den Impfstoff allgemein an die praktischen Ärzte abzugeben, so erscheint uns nach unseren Erfahrungen ein solches Verfahren bedenklich und auch eine Behandlung etwa durch den zuständigen Kreisarzt als durchaus unzweckmäßig; wir sind jedenfalls bald davon abgekommen, in solchen Fällen Impfstoff abzugeben. Am ehesten Berechtigung haben größere Behandlungsstellen, die an ein mit chirurgischer Einrichtung versehenes Krankenhaus oder an eine Lymphanstalt angeschlossen sind und deren Leiter sich zuvor mit allen Einzelheiten der Diagnose, Indikationsstellung, Behandlung und Kontrolle der Patienten vertraut gemacht haben und allmählich eigene Erfahrungen sammeln. Solche Stellen können für die in der Nähe wohnenden Patienten, besonders wenn diese ohne Schwierigkeit täglich von ihrer Wohnung zur Behandlung kommen können, eine wesentliche Erleichterung bedeuten.

Im Laufe der Zeit haben wir uns aber überzeugt, daß zum mindesten für unsere deutschen Verhältnisse in normalen Zeiten eine weitergehende Dezentralisation der Behandlung sich nicht eignet, indem ihre Nachteile weit größer als ihre Vorteile sind. Sie ist weder für den Staat noch, von besonderen Fällen abgesehen, für den Patienten billiger als die Behandlung an einem Zentralinstitut, vielmehr im ganzen kostspieliger. Die Erfahrung hat gelehrt, daß nicht einmal die Asepsis, die natürlich die erste Voraussetzung für die Injektionsbehandlung ist, überall genügend gewahrt wurde. Dazu kommen Nachteile, die in der Eigenart der Wutschutzbehandlung begründet sind. Die Entscheidung, ob im Einzelfalle eine Behandlung nötig ist, erfordert spezialistische Erfahrung, die nur durch längere Übung erworben werden kann. Das führt dazu, daß an manchen Behandlungsstellen, die nicht ständig Patienten zu behandeln haben, viele Behandlungen vorgenommen werden, die hätten unterbleiben können. Auch die Beurteilung etwaiger Impfstörungen setzt besondere Erfahrung voraus. Schließlich wird auch die Übersicht über die jeweilige Ausbreitung der Tollwut, deren Kenntnis bei der Entscheidung, ob ein von einem verdächtigen Hunde Gebissener behandelt werden soll, von wesentlicher Bedeutung sein kann, sowie vor allem die Beobachtung der Behandelten und ihre statistische Erfassung außerordentlich erschwert. Es bedarf keiner weiteren Ausführung, daß dieser Punkt gerade zu einer Zeit, wo über ein verändertes Behandlungsverfahren erst Erfahrungen gesammelt werden sollen, von besonderer Bedeutung ist.

Schlußsätze.

1. Ebensowenig wie aus dem von *Papamarku* mitgeteilten Material läßt sich aus den Beobachtungen während unserer Berichtszeit eine Bestätigung der vielfach vertretenen Ansicht entnehmen, daß bei der Behandlung mit getrocknetem Passagemark nach *Pasteur* die Häufigkeit der Lyssaerkrankungen bei intensiverer Behandlung abnimmt.

Auffällig ist eine stetige Abnahme der Mortalität unter unseren Patienten seit Errichtung der Station, wie sie ähnlich auch in den Zahlen des Pariser Instituts zutage tritt.

2. Unter den 3220 nach der Methode von *Högyes-Phillips* behandelten Patienten waren die Lyssafälle noch erheblich seltener als während der letzten Periode der Behandlung nach *Pasteur*, nämlich 0,12% gegenüber 0,45%; die reduzierte Mortalität betrug 0 gegenüber 0,14% nach *Pasteur*.

3. Bei der Behandlung nach *Pasteur* traten in unserer Station Impflähmungen um so häufiger, um so früher und um so schwerer auf, je intensiver die Behandlung war; dasselbe hat *v. d. H. van Genderen* in Java beobachtet.

4. Bei der Behandlung nach *Högyes-Phillips* sahen wir prozentual weniger, dafür aber durchschnittlich schwerere Lähmungen als bei der Behandlung nach *Pasteur*. Auch *v. d. H. van Genderen* hat in Java an den nach *Högyes* behandelten Europäern ein Überwiegen der schweren Lähmungen beobachtet; ferner ergab sich dort, daß bei stärkerer Dosierung die Lähmungen häufiger wurden, während andererseits die Lyssafälle abnahmen.

5. Was die Entstehung der Lähmungen angeht, so beruhen sie unsrer Ansicht nach in der Mehrzahl auf Infektionen mit Virus fixe; doch mögen auch Giftstoffe bei ihrer Entstehung eine Rolle spielen.

6. Durch Verbesserung und Vereinheitlichung der Berichterstattung könnten die in den Pasteur-Instituten der verschiedenen Länder gemachten Erfahrungen für die übrigen Stationen besser nutzbar gemacht und die Klärung der noch immer strittigen Frage gefördert werden, welchen Einfluß die zahlreichen Modifikationen der Wutschutzbehandlung einerseits auf den Erfolg bezüglich der Verhütung der Lyssa, andrerseits auf die Häufigkeit der Impflähmungen haben.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Papamarku*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **86**, 85. 1918. — [2]) *Phillips*, Journ. of immunol. **7**, 409. 1922. — [3]) *v. d. H. van Genderen*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 427. 1925. — [4]) *Kraus*, Wien. klin. Wochenschr. 1923, Nr. 27. — [5]) *Koritschoner* und *Schweinburg*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **42**, 217. 1925. — [6]) *Knack*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **106**, 36. 1926. — [7]) *Koch, Jos.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **64**,

258. 1909 und **67**, 31. 1910; Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **64**, 199. 1912. — [8]) *Simon*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I. Orig. **65**, 359. 1910. — [9]) *Pfeilschmidt*, Zentralbl. f. Neurol. 1908, S. 1060. — [10]) *Isabolinsky* und *Zeitlin*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., **45**, 301. 1925. — [11]) *Hermann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **95**, 69. 1925. — [12]) *Harris*, Journ. of infect. dis. **8**, 47. 1911 und **13**, 155. 1913. — [13]) *Babes*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **65**, 401. 1910 und **69**, 397. 1911. — [14]) *Remlinger*, Ann. de l'inst. Pasteur **19**, 625. 1905 — [15]) *Marie*, Kraus-Levaditi, Handbuch, I. Erg.-Bd., S. 444. — [16]) *Alivisatos*, Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 9. — [17]) *Hempt*, Ann. de l'inst. Pasteur **39**, 632. 1925. — [18]) *Remlinger*, Ann. de l'inst. Pasteur **33**, 616. 1919. — [19]) *Paltauf*, Wien. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 29. — [20]) *Quast*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **97**, 53. 1926. — [21]) *Remlinger*, Arch. Inst. Pasteur Tunis **13**. 1925. — [22]) *Joannovitch*, Office Internat. d'Hyg. Publ. **17**, 618. 1925. — [23]) *Rose* und *Walthard*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 645. 1926.

Bemerkungen zu der vorstehenden Arbeit von Boecker.

Von
Prof. Dr. **Jos. Koch.**

Auf Grund meiner Erfahrungen kann ich mich den Schlußfolgerungen von *Boecker*, der ebenso wie vor ihm *Papamarku* seine Beweisführung hauptsächlich auf statistische Erhebungen stützt, nicht anschließen. Ich halte die auf der Berliner Wutschutzabteilung vorgekommenen Fälle, die ich seit Ende des Krieges, mit Ausnahme der in der Zeit vom 1. II. 1923 bis 1. X. 1924 festgestellten, alle selbst klinisch beobachtet, und soweit sie tödlich endeten, histologisch und im Tierversuch eingehend studiert habe, teils für abortive Straßenwuterkrankungen, teils für wirkliche paralytische Wut, eine Erkrankungsform, wie sie ja verhältnismäßig oft beim Menschen beobachtet und in der Literatur bereits öfter beschrieben worden ist. In der letzten Zeit ist das noch bei einem Fall von *Knack* (diese Zeitschr. **106**, 36) geschehen.

In einer 18jährigen Praxis, in der ich Tausende von Personen beraten und während der Schutzimpfung beobachtet habe, habe ich bisher keinen Fall erlebt, der als „Impfwut" auszulegen gewesen wäre, obschon unter diesen Patienten sich zahlreiche Neurastheniker und solche mit geschwächtem Nervensystem befunden haben, die, ohne gebissen oder verletzt zu sein, nur auf ausdrückliches Verlangen oder zu ihrer Beruhigung prophylaktisch behandelt worden sind. Wenn Erkrankungen des Nervensystems wie Paraplegien, Facialislähmungen usw. auftraten, Bilder, die auch *ohne* Schutzimpfung durch Straßenvirusinfektion entstehen und beschrieben worden sind, so handelte es sich bei den Fällen der Berliner Abteilung stets um solche Patienten, die von Hunden oder anderen Tieren verletzt worden waren, deren Straßenwut entweder einwandfrei festgestellt worden oder als sehr wahrscheinlich angenommen werden konnte, wo also eine Straßenwutinfektion durchaus im Bereich der Möglichkeit lag. Das trifft auch für die von *Boecker* beobachteten Fälle zu; sie gehören sämtlich der Rubrik A und B an. Meine Ansicht von der Ungefährlichkeit der Pasteurschen Behandlung, sowie sie in ihrer ursprünglichen und modifizierten Form auf der Berliner Abteilung geübt wurde und noch geübt wird, wird auch nicht erschüttert durch die vor kurzem

erschienene Arbeit von *Jeanne van den Hoven van Genderen* (diese Zeitschr. **105**, 427), die über die Erfahrungen der Pasteurschen Behandlung auf Java berichtet und sich ebenfalls in der Hauptsache auf statistische Zusammenstellungen stützt. Die in den Tropen gemachten Beobachtungen lassen sich übrigens mit unseren nicht vergleichen, da die dortigen Patienten mit ungleich größeren Dosen des Virus fixe behandelt wurden und zum Teil an Malaria und anderen Krankheiten litten.

Die ausführliche theoretische Begründung meines Standpunktes und die Kritik der neueren, in dieser Angelegenheit erschienenen Arbeiten werde ich später in einer besonderen Arbeit geben. Bei dieser Gelegenheit würde auch noch die Frage zu erörtern sein, inwiefern die Wutschutzimpfung imstande ist, sich mit bereits bestehenden Krankheiten wie Malaria, Tuberkulose, Nervenkrankheiten zu komplizieren und ob es sich nicht in manchen Fällen um eine *kombinierte Wirkung von Straßen- und Passagevirus* handelt, ein Gedanke, der sehr naheliegt, der aber auffallenderweise bisher nicht in Betracht gezogen ist. Da die Frage der sog. Impfwut eine erhebliche praktische Bedeutung hat, auch um einer Beunruhigung des Publikums entgegenzutreten, hielt ich mich als Leiter der Berliner Wutschutzabteilung für verpflichtet, meiner Ansicht, der sich seinerzeit auch *Jochmann* auf Grund klinischer Beobachtungen angeschlossen hat, Ausdruck zu geben. Auch ich habe der Schutzimpfung *Pasteurs* zuerst skeptisch gegenübergestanden. Aber je mehr praktische und experimentelle Erfahrungen ich auf diesem Gebiete sammeln durfte, desto mehr habe ich mich von der Unschädlichkeit seines Verfahrens und seiner segensreichen Wirkung überzeugen können, desto mehr habe ich die vorsichtige und doch kühne Art des Vorgehens *Pasteurs* bewundern müssen.

(Aus der Bakteriologisch-Serologischen Abteilung der Höchster Farbwerke.)

Die Bildung antiinfektiöser Immunkörper bei hungernden Kaninchen.

Von

R. Bieling.

Aus früher mitgeteilten Versuchen hatte sich ergeben, daß qualitative und quantitative Unterernährung, insbesondere bei jungen, wachsenden Tieren, die Bildung von Antitoxinen sowie einer antitoxischen Immunität stört. Es war nun weiterhin zu untersuchen, welchen Einfluß Hunger auf die Bildung antibakterieller bzw. antiinfektiöser Immunstoffe ausübt.

Zu diesem Zwecke wurden 6 junge Kaninchen eines Wurfes, mit einem Gewicht von rund 1200 g, in 2 Gruppen getrennt. 3 Tiere, 1 Männchen und 2 Weibchen, blieben bei der Mutter und erhielten reichlich gutes Futter: Heu, Hafer, Klee und Rüben. Die 3 anderen Tiere, ebenfalls 1 Männchen und 2 Weibchen, wurden getrennt gehalten und erhielten ausschließlich Heu und ein wenig Klee. Die Menge des Futters wurde so gering bemessen, daß keine Gewichtszunahme zustande kam. Gelegentlich wurde ein völliger Hungertag eingeschaltet. 1 Hungertier (Nr. 6) wurde einmal 6 Stunden zu reichlichem Futter gesetzt, weil es am Vortag einen bedrohlichen Gewichtssturz gezeigt hatte.

Der Versuch begann am 8. IX. und endete am 26. X. In dieser Zeit hatten die gut ernährten Tiere ihr Gewicht ungefähr verdoppelt.

Kaninchen Nr.	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g
1	1228	2400
2	1100	2460
3	1150	2230

Die 3 schlecht ernährten Tiere hatten ihr Anfangsgewicht ohne erhebliche Schwankungen erhalten:

Kaninchen Nr.	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g
4	1300	1360
5	1320	1250
6	1170	1170

In dieser ganzen Zeit wurden die 6 Kaninchen gleichmäßig immunisiert durch subcutane Injektionen steigender Mengen von Rotlauf-

kultur so, wie sie zur Schweineimpfung abgegeben wird. Die 1. Injektion erfolgte am 15. IX., also 7 Tage nach Beginn des Hungers von Tier 4 bis 6. Sie betrug 0,5 ccm Rotlaufimpfkultur. In den folgenden Tagen wurden 0,7, 1,0, 1,5 und 2 ccm Impfkultur injiziert, die letzte Injektion war am 6. X. Am 13. X., also 7 Tage nach der letzten Injektion, wurden bei allen Tieren Blutproben entnommen und das Serum auf seinen Gehalt an antiinfektiösen Immunstoffen an der Maus geprüft. Am 27. X. erhielten sämtliche Tiere nochmals 2 ccm Impfstoff subcutan, und am 3. XI. wurde eine zweite Blutprobe entnommen und geprüft. — Die Prüfung des Kaninchenserums erfolgte in der gleichen Weise wie bei der staatlichen Prüfung des Rotlaufimmunserums.

Weiße Mäuse erhielten verschiedene Mengen des zu prüfenden Serums subcutan und wurden 2—4 Stunden darnach mit einer sicher tödlichen Rotlaufkultur (1,0 ccm $^1/_{10\,000}$ einer 24 stündigen Fleischbrühkultur ip.) nachinfiziert. Die Kontrollmäuse erhielten nur Kultur. Das Ergebnis der beiden Prüfungen zeigen die folgenden Tabellen 1 und 2.

Tabelle 1. *Prüfung am 13. X.*

Kaninchen Nr.	Serummenge in ccm	Verhalten der Prüfungsmaus
1	0,5	glatt entlassen am 10. Tag
	0,25	krank am 10. Tag
2	0,5	krank am 10. Tag
	0,25	tot am 7. Tag
3	0,5	krank am 10. Tag
	0,25	tot am 9. Tag
4	0,35	tot am 7. Tag
	0,25	tot am 7. Tag
5	0,5	glatt entlassen am 10. Tag
	0,25	glatt entlassen am 10. Tag
6	0,5	glatt entlassen am 10. Tag
	0,25	glatt entlassen am 10. Tag
2 Kontrollen	—	tot am 3. Tag

Der Gehalt an Immunkörpern bei der ersten Prüfung (Tab. 1) war also bei den Hungertieren 4—6 eher noch etwas größer als bei den während der Immunisierung gut genährten 1—3.

Auch bei der zweiten Prüfung (s. Tab. 2) war das Serum sämtlicher 6 immunisierter Kaninchen imstande, die Rotlaufinfektion entweder stark zu verzögern oder völlig zu verhindern. Ein gut genährtes Tier (Nr. 2) und ein Hungertier (Nr. 6) hatten besonders viel Immunkörper gebildet. 0,1 ccm genügte noch zur Verhinderung der Infektion. Die übrigen Sera wirkten schwächer. *Ein Unterschied in der Wirkungsstärke der Sera der gut genährten und der Hungertiere war nicht festzustellen.*

Tabelle 2. *Prüfung am 4. XI.*

Kaninchen Nr.	Serummenge in ccm	Verhalten der Prüfungsmaus
1	0,5	glatt entlassen am 12. Tag
	0,25	tot am 8. Tag
	0,1	tot am 5. Tag
2	0,4	glatt entlassen am 12. Tage
	0,25	glatt entlassen am 12. Tage
	0,1	glatt entlassen am 12. Tage
3	0,4	tot am 11. Tage
	0,25	tot am 11. Tage
	0,1	tot am 10. Tage
4	0,5	tot am 12. Tage
	0,25	tot am 10. Tage
	0,1	tot am 6. Tage
5	0,4	krank am 12. Tage
	0,25	tot am 11. Tage
	0,1	tot am 10. Tage
6	0,5	glatt entlassen am 12. Tage
	0,25	glatt entlassen am 12. Tage
	0,1	glatt entlassen am 12. Tage
2 Kontrollen	—	tot am 4. Tage

Hunger und Unterernährung, welche bei jungen, wachsenden *Ratten* oder *Meerschweinchen* die Ausbildung einer *antitoxischen Immunität* stören, übten im Gegensatz hierzu auf die Entwicklung einer *antiinfektiösen Immunität gegen Rotlaufbacillen* bei *Kaninchen* keinen Einfluß aus. — Diese Beobachtung stimmt überein mit den Erfahrungen bei der Großdarstellung von Immunseren. Auch hier hat sich gezeigt, daß eine reichliche und gute Ernährung für die Antitoxin produzierenden Pferde von sehr viel größerer Bedeutung ist als für die antiinfektiöse Immunkörper bildenden Pferde.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. — Direktor: Geh. Hofrat Prof. Dr. *Martin Hahn*, Abt.-Leiter: Prof. Dr. *Bruno Heymann*.)

Die Isolierung von Bakterien im Dunkelfeld: Ein-Zell-Kulturen und Tierimpfung mit einem einzelnen Bacterium.

Von

T. Péterfi und L. Wámoscher.

Mit 5 Textabbildungen.

Die Anwendung mikrurgischer Methoden in der Bakteriologie war bisher weniger aus technischen, als viel eher aus optischen Gründen erschwert. Wie schon die Arbeiten der ersten Begründer der Mikrurgie *S. L. Schouten*[1]) und *Barber*[2]) beweisen, waren die rein technischen Probleme der Behandlung einzelner Bakterien mit Mikroinstrumenten von diesen Forschern, und zwar mit verhältnismäßig noch primitiven Mikromanipulatoren, im Prinzip gelöst. Noch günstigere Arbeitsbedingungen bieten natürlicherweise die modernen Mikromanipulatoren von *Chambers* und *Zeiss* mit ihren Feinschraubensystemen[3]). Wenn also die mikrurgische Literatur — von den Veröffentlichungen *Schoutens* und einer rein methodischen Mitteilung von *M. Kahn*[4]) (der mit den *Chamber*schen Mikropipetten einzelne Bakterien isolierte) abgesehen — keine ausgiebigere Produktion auf bakteriologischem Gebiete aufzuweisen hat, so muß diese Tatsache aus dem Umstand erklärt werden, daß bisher die Manipulationen an lebenden und ungefärbten Bakterien im *Hellfelde* ausgeführt werden mußten.

Die Schwierigkeiten und die Mängel der Lebenduntersuchung ungefärbter Bakterien bei Hellfeldbeleuchtung sind jedem Bakteriologen genügend bekannt. Noch hemmender wirken aber die ungünstigen optischen Verhältnisse im Falle einer mikrurgischen Arbeit, wo die Bak-

---

[1]) *Schouten, S. L.*, Reinkulturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie **22**, 10. 1903.

[2]) *Barber, M. A.*, A new method of isolating microorganisms. Journ. Cans. Med. Soc. **4**, 487. 1904.

[3]) *Chambers, R.*, New micromanipulator and methods for the isolation of a single bacterium and the manipulation of the living cells. Journ. of infect. dis. **31**, 334. 1922.

[4]) *Kahn, C. M.*, Chambers micromanipulator for the isolation of a single bacterium. Journ. of infect. dis. **31**, 334. 1922.

terien außerhalb der Schnittweite der Hellfeldkondensoren mit stärksten Objektivsystemen sichtbar gemacht werden müssen. Wie schon wiederholt beschrieben wurde[1]), liegt das Objekt einer Mikromanipulation 10 bzw. 5 mm hoch oberhalb der Schnittweite unserer gebräuchlichen Kondensoren auf der feuchten Kammer. Für die meisten Arbeiten genügt aber auch so das vom Kondensor gespendete Licht, und man erhält mit mittelstarken Vergrößerungen noch ein gut ausgeleuchtetes Sehfeld. Je stärkere Vergrößerungen man anwendet, um so mangelhafter erweist sich jedoch die so erreichbare Beleuchtung und ist man außerdem noch gezwungen, eine enge Blendenöffnung zu benutzen, wie das zur Sichtbarmachung ungefärbter Strukturen meist notwendig ist, so gestaltet sich die mikrurgische Arbeit sehr mühselig und trotz allem unzuverläßlich. Verhältnismäßig große Stäbchen oder Spirillen, wie z. B. Bacillus Proteus, B. fusiformis, Milzbrandbacillen und verschiedene Spirillenarten können immerhin noch, selbst unter diesen ungünstigen optischen Verhältnissen, im Hellfeld der mikrurgischen Behandlung unterzogen werden. Die kleineren Bakterien, so z. B. die meisten pathogenen Mikroorganismen und vor allem Kokken und Sporen, sind jedoch in ungefärbtem Zustande einer mikrurgischen Behandlung im Hellfelde kaum zugänglich.

Um so mehr müssen die Leistungen von *S. L. Schouten* hervorgehoben werden, denn er isolierte und behandelte schon im Hellfeld mit großer Sicherheit einzelne Bakterien. Einer von uns (*Péterfi*) konnte sich persönlich davon überzeugen, daß mit der Schoutenschen Technik die Isolierung und Zerschneidung einzelner Milzbrandbacillen einwandfrei gelingt. Die Handhabung des Schoutenschen Apparates ist jedoch noch in hohem Maße von der technischen Begabung des Mikrurgen abhängig. Doch dürfte selbst *Schouten* kaum imstande sein, Mikromanipulationen mit kleineren Bakterien im Hellfelde mit der uns erforderlich scheinenden Genauigkeit auszuführen.

Auf Grund dieser Erfahrungen wurden die Präparierwechselkondensoren (kurz P.-W.-Kondensoren) von der Firma Carl Zeiss hergestellt, die die mikrurgische Arbeit auch im Dunkelfeld ermöglichen (Abb. 1). Da die Kondensoren an anderen Stellen schon eingehender beschrieben wurden[2]) und noch beschrieben werden[3]), sehen wir hier von ihrer Schilderung ab und beschränken uns auf Angaben über ihre Verwendung bei bakteriologischen Manipulationen. Einleitend müssen wir jedoch erwähnen, daß die P.-W.-Kondensoren in 2 Ausführungen zur Anwendung gelangen, 1. für schwache und 2. für mittelstarke Objektivsysteme. Die schwachen P.-W.-Kondensoren haben eine Schnittweite von 10 mm und eine Apertur von 0,4 (einschließlich), die starken

---

[1]) *Péterfi, T.*, Mikrurgische Methodik im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden; herausgeg. von E. Abderhalden, Abt. V, Teil 2, S. 479—516. 1924.

[2]) *T. Péterfi*, a. a. O.

[3]) Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie 1926 im Druck.

eine Schnittweite von 4—4$^1/_2$ mm und eine Apertur von 0,65 (einschl.). Dementsprechend läßt sich mit dem schwachen P.-W.-Kondensor ein Dunkelfeld nur bei Objektiven erzielen, deren num. Ap. nicht über 0,4 reicht (Zeissobjektiv A, Leitzobjektiv 3). Für den stärkeren P.-W.-Kondensor liegt entsprechend diese Grenze bei Objektiven von der num. Ap. 0,65 (Zeissobj. D, Leitz 6). Durch Anwendung geeigneter Aperturblenden können jedoch auch stärkere Objektive benutzt werden. So haben wir mit dem Zeissapochromat 4 mm, dessen Apertur auf 0,61 verringert wurde, gute Resultate erzielt.

Die durch die optische Konstruktion bedingte größere Schnittweite der P.-W.-Kondensoren gestattet Manipulationen im Dunkelfeld an Objekten, die 10 bzw. 4$^1/_2$ mm hoch auf der feuchten Kammer liegen. Es ist offenkundig, daß sowohl die Herstellung wie auch die Führung

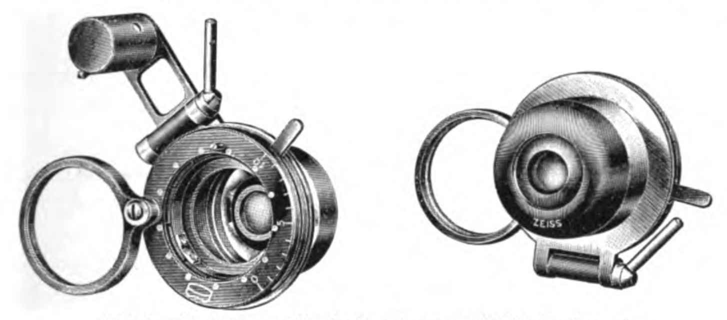


Abb. 1. Die Präparier-Wechselkondensoren (P.-W.-Kondensor).

der Mikroinstrumente bei einer 10 mm hohen Kammer bedeutend leichter zu erzielen ist, als bei einer solchen von nur 4 mm Höhe. Auch sind die Manipulationen in dem durch die schwache Vergrößerung gebotenen Sehfelde leichter ausführbar. Es ist daher vor allem zu entscheiden, ob man bei der vorzunehmenden Arbeit mit dem schwachen P.-W.-Kondensor auskommt, oder ob die Beschaffenheit der Arbeitsobjekte unbedingt das Verwenden des stärkeren P.-W.-Kondensors erfordert. Hierbei soll daran erinnert werden, daß in der Dunkelfeldmikroskopie die Vergrößerung des Mikroskopes eine *weit* geringere Rolle spielt, als bei der Hellfeldbeobachtung. Haben wir Objektive, deren Apertur ausreichend ist zur optischen Auflösung der einzelnen Objektpunkte, so werden letztere im Dunkelfeld deutlich einzeln abgebildet und die weitere Bildvergrößerung läßt sich einfach durch Kombination mit stärkeren Okularen erreichen. Im allgemeinen erfordert die optische Auflösung der Bakterien im Dunkelfeld keine höhere Apertur als 0,65. Größere Bacillen und Spirillen sind im Dunkelfeld schon mit Objektiven von der num. Ap. 0,4, kleinere Stäbchen, Kokken und Sporen mit solchen von der num. Ap. 0,65 deutlich sichtbar, wenn man

Okulare 15 bis 20 × verwendet. Demnach sind Dunkelfeldmanipulationen an größeren bakteriologischen Objekten schon mit schwachen Objektiven und in einer 10 mm hohen Kammer ausführbar (schwacher P.-W.-Kondensor), wogegen die mikrurgische Behandlung kleiner Bakterien im Dunkelfeld nur mit dem stärkeren P.-W.-Kondensor, d. h. in einer $4^1/_2$ mm hohen Feuchtkammer erfolgen kann.

Wir möchten im folgenden hauptsächlich jenes Verfahren schildern, das wir für die letztere und schwierigere Art der Dunkelfeldmanipulation ausgearbeitet haben. Die spezielle bakteriologische Aufgabe, zu deren Lösung diese Methodik geschaffen wurde, bestand nämlich in der Einzelisolierung von Pneumokokken, also von bakteriologischen Objekten, deren mikrurgische Behandlung im Dunkelfelde an den stärkeren P.-W.-Kondensor gebunden war. Die hierbei erzielten bakteriologischen Ergebnisse wird einer von uns (*Wámoscher*) in der nächsten Zeit in dieser Zeitschrift veröffentlichen.

An dieser Stelle soll daher nur die Methodik der Untersuchungen geschildert werden, da ihr eine allgemeine Geltung für alle derartigen Dunkelfeldmanipulationen zukommen dürfte.

Zunächst wollen wir erwähnen, daß wir zu diesen bakteriologischen Untersuchungen statt der üblichen feuchten Kammer von *Péterfi*, eine niedrige, d. h. nur 4,5 mm hohe benutzt haben. Arbeitet man nämlich mit starken Objektiven und dem starken P.-W.-Kondensor, so muß bei der üblichen Form der *Péterfi*schen Kammer das mit dem Objekt beschickte Deckglas in zwei innerhalb der Kammerseitenwände eingeschnittene Längsrinnen eingeschoben werden. Dabei ergibt sich der störende Umstand, daß man während der Manipulation die Kammer nur in seitlicher Richtung frei bewegen kann. Nach vorn und hinten ist die Bewegungsfreiheit dadurch bedeutend eingeschränkt, daß die Fassung des in die Kammer auf das Objekt eingestellten Objektivs leicht an die innere Kammerwand stößt. Bei Untersuchungen, wo man die stärkere Vergrößerung nur selten und mehr zur Kontrolle der Manipulationswirkung, nicht aber zur eigentlichen Ausführung derselben benutzt, läßt sich auch mit der *Péterfi*schen Kammer arbeiten. Bei den bakteriologischen Manipulationen jedoch, wo — wie bei unseren Untersuchungen — stets starke Objektive zur Arbeit erforderlich sind, ist es von wesentlichem Vorteil, wenn das Objekt auf der oberen Fläche einer 4,5 mm hohen Kammer, und nicht innerhalb einer 10 mm hohen liegt. So haben wir also die obere Hälfte der ursprünglichen *Péterfi*schen Feuchtkammer abtragen lassen und erhielten dadurch die entsprechend niedrigere, bei der Bewegungen in jeder Richtung ungehindert ausführbar sind (Abb. 2).

Eine solche niedrige Feuchtkammer läßt sich aus einem dünnen Objektträger mit angekitteten Glasstreifen leicht improvisieren. Es muß nur beachtet werden,

daß nicht die zur Wand der Kammer bestimmten Glasstreifen allein, sondern die Höhe dieser Wände mit der Objektträgerdicke zusammen 4,5 mm betragen muß. Liegt nämlich das auf diese Feuchtkammer gesetzte Deckglas selbst nur Bruchteile eines Millimeters höher als 4,5 mm, so kann dies die Dunkelfeldbeleuchtung vereiteln.

Um in einer solchen Kammer trotz ihrer geringen Höhe mit den Instrumenten ungestört arbeiten zu können, müssen die Mikronadeln oder Mikropipetten entsprechend hergestellt werden. Es ist leicht begreiflich, daß *der* Teil des Instrumentes, der innerhalb der Kammer liegen wird, höchstens 1 mm dick und der nach oben gebogene Endteil nicht länger als 2—2,5 mm sein darf. Bei diesen Massen bleibt zwischen

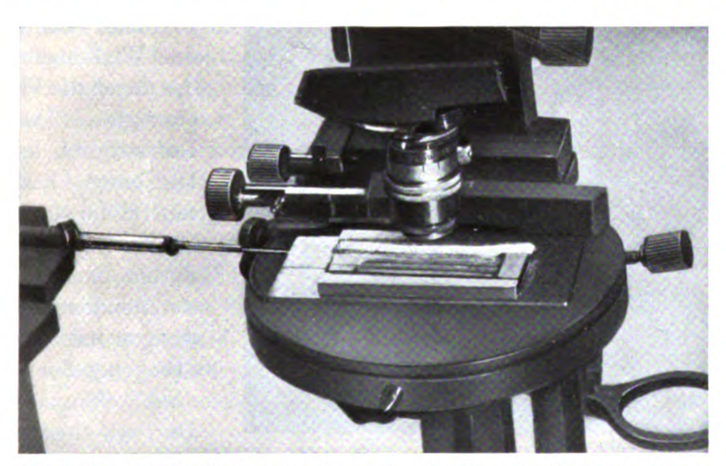


Abb. 2. Die Aufstellung zu einer mikrurgischen Isolierung in der 4,5 mm hohen feuchten Kammer mit der Mikropipette.

dem Endteil des bis zu dem Kammerboden gesenkten Instrumentes und dem Deckglas noch immer ein freier Raum von 1 mm Höhe, der zu einer ungestörten Arbeit vollkommen genügt. Man achte jedoch selbst bei den so geformten Instrumenten genau darauf, daß der innerhalb der Kammer liegende Teil wagerecht stehen soll (Libelle!). Steht das Instrument schief nach oben oder nach unten, so wird im ersten Fall beim Senken, im zweiten beim Heben, sein dickerer Teil an den Boden der Kammer bzw. an das Deckglas anstoßen, noch bevor der Endteil entsprechend gesenkt oder gehoben werden konnte.

Wir haben ausschließlich mit Mikropipetten gearbeitet, deren Mündung 3—5 μ betragen hat. Solche Pipetten werden folgendermaßen hergestellt[1]: Aus einem dünnwandigen Glasrohr werden etwa 1 mm dicke Capillaren verfertigt. Das Ende eines 15—20 cm langen Stückes

[1]) Die ausführliche Beschreibung der Mikroinstrumentenherstellung siehe *Péterfi*, a. a. O.

wird oberhalb der Mikroflamme zu einem feinen, mit freiem Auge kaum noch sichtbaren Faden ausgezogen und *vor* der Flamme, d. h. „kalt" auseinandergerissen. Nun erfolgt der schwierigste Teil der Pipettenherstellung: die Mündung soll senkrecht nach oben gebogen werden. Ein 1—2 mm langes Stück läßt sich nämlich in der üblichen Weise mit Hilfe einer Metallnadel kaum nach oben biegen. Wir verfahren daher so, daß wir das ausgezogene feine Ende der Capillare hoch über die Mikroflamme halten, und zwar derart, daß die Verlängerung des Flammenkegels die Mikropipette ca. 3 mm vor dem ausgezogenen feinen Ende senkrecht schneiden würde. Nun senken wir die Pipette soweit gegen die Flamme, bis sie in den Wirkungsbereich des durch die Flamme erzeugten warmen Luftstromes kommt. In einer bestimmten Höhe über der Flamme wird nun durch die nach oben strömende warme Luft das gewünschte kleine Stückchen der Pipette nach oben geweht. Die so hergestellte „Mikrokanüle" wird an die elektrische Heizpipette luftdicht angebracht und bei schwacher und starker Vergrößerung in der Feuchtkammer zentriert (Abb. 3). Hat man sich davon überzeugt, daß die Pipettenmündung bei allen in Betracht kommenden Vergrößerungen in der optischen Achse, und daß die ganze Zirkumferenz ihrer Mündung wagerecht, d. h. in einer optischen Ebene liegt, so stellt man das Deckglas mit dem bakterienhaltigen „Kulturtropfen" und dem etwa noch sonst nötigen anderen Tröpfchen auf die Feuchtkammer und beginnt die Manipulation.

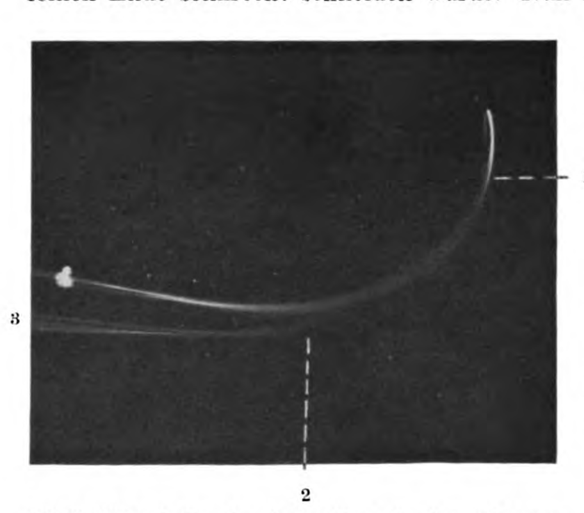


Abb. 3. Mikropipette. 1 = Senkrecht nach oben gebogener Teil 2 mm lang. 2 = Wagerechter Teil $^1/_2$—1 cm lang. 3 = Dicke der Capillare 1 mm.

Bevor wir die Ausführung der eigentlichen Manipulation beschreiben, müssen noch technische Einzelheiten bezüglich der Feuchthaltung der Kammer, Reinigung der Deckgläser und Gestaltung der Tröpfchen angegeben werden.

Die Kammer ist am zweckmäßigsten feucht zu halten, indem an die beiden inneren Längswände zwei ca. 2 mm hohe, vorher in Wasser getauchte Fließpapierstreifen angebracht werden. Bei der geringen

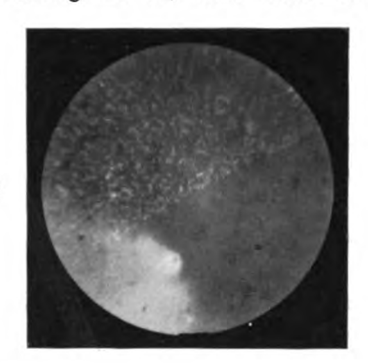
Höhe der Kammer kann zuviel Feuchtigkeit leicht zu unliebsamen Störungen führen. Es können sich nämlich im Laufe der Mikromanipulation aus der mit Wasserdampf gesättigten Kammerluft feinste Tröpfchen auf das Deckglas niederschlagen. Diese können nun einerseits zu Verwechslungen Anlaß geben und das Auffinden des Kultur- oder Kochsalztropfens erschweren, andererseits gestalten sie die Ausführung und das Resultat einer Einzelisolierung dadurch unsicher, daß sie miteinander, mit dem Kulturtropfen oder mit dem isolierten Tröpfchen zusammenfließen können und dadurch Verschleppung von Keimen verursachen. Aus diesem Grunde wird der Kammerboden nicht, wie sonst üblich, mit einer Wasserschicht bedeckt. Die Fließpapierstreifen müssen stets mit Wasser gut durchtränkt sein. Im allgemeinen reicht die so erzielbare Feuchtigkeit der Kammer aus, um ein Austrocknen selbst bei längerer Arbeit ($^1/_2$—1 Stunde) zu verhindern. Da man aber am zweckmäßigsten mit Bogenlicht arbeitet, ist es empfehlenswert, die von der Beleuchtung gespendeten Wärmestrahlen durch Kühlfilter (am besten durch eine Lösung von Chinin. sulf.) zurückzuhalten.

Von großer Wichtigkeit für die Arbeit ist die Beschaffenheit der Deckglasoberfläche, an die die Tröpfchen angelegt werden. Um ein brauchbares Dunkelfeldbild zu erhalten, müssen die Tropfen möglichst flach geformt sein. Ist die nach unten freie Grenzfläche des Tropfens stark gewölbt, so entsteht im Dunkelfeld an solchen gekrümmten Flächen eine Reflexion, die das Bild überstrahlen wird. Man erhält dann von solchen Tropfen ein opakes, weißleuchtendes Bild, in dem die Bakterien sehr schwer oder überhaupt nicht sichtbar sind. Flache Tröpfchen bekommt man nur, wenn die Deckglasoberfläche peinlich sauber und von jeder Spur Fett frei ist. Wir reinigen also die Deckgläser erst in Kaliumbichromatschwefelsäurelösung, waschen sie dann in Wasser, trocknen sie ab, bewahren sie staubfrei auf und sterilisieren sie vor dem Gebrauch in der Flamme. (3—4 mal durchziehen!)

Nun wird die Mitte eines solchen Deckglases mit einem Tröpfchen flüssiger Bakterienkultur und daneben in einer Entfernung von etwa 3—4 mm mit einem Tröpfchen physiolog. Kochsalz- oder Nährbodenlösung beschickt, das Deckglas auf die feuchte Kammer gelegt und mit Vaseline abgedichtet. Der Kochsalz- oder Nährbodentropfen wird jetzt zentriert, die Pipettenmündung in diesen hineingehoben, um sie zu füllen. Das Saugen der Pipette läßt sich im Dunkelfeld an dem Heranströmen der im Tropfen befindlichen Ultrateilchen (zufällige Verunreinigungen durch Staubteilchen) besonders gut verfolgen. Nach einigen Minuten ist die Pipette genügend gefüllt, sie wird also gesenkt und an Stelle des NaCl-Tropfens der Kulturtropfen zentriert. Für das Aufsuchen und Einstellen dieser Tröpfchen ist es empfehlenswert, hintereinander Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung anzuwenden, was sich mit

den P.-W.-Kondensoren rasch und bequem durchführen läßt. Im Dunkelfeld ist nämlich die Orientierung über das Präparat und über die Lage der Instrumente bedeutend schwieriger als im Hellfeld; besonders mühselig ist es, den Rand eines flachen, reinen

A



B

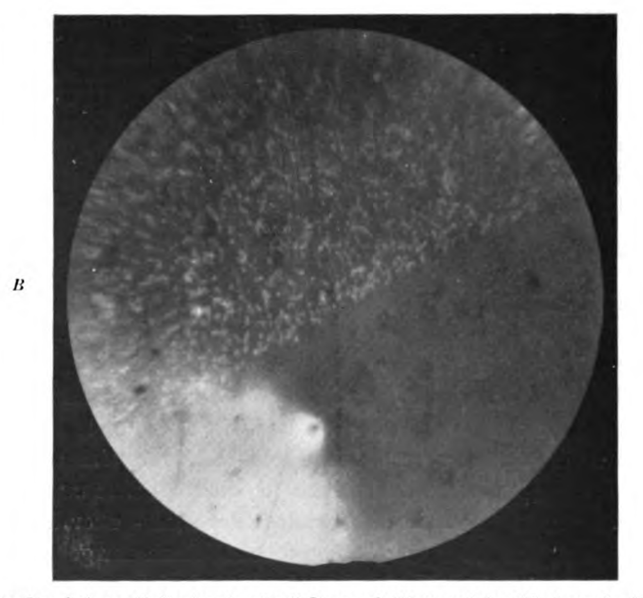
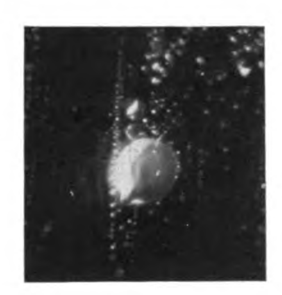


Abb. 4. Der Rand eines „Kulturtropfens" mit Pneumokokken und der Mündung der Mikropipette. *A* = Vergr. Zeiss Obj. D. Phoku (220 fach). *B* = Photographisch vergrößertes Bild von *A*.

Flüssigkeitstropfens zu erkennen. Aus diesem Grunde stellen wir zunächst bei schwacher, dann bei starker Vergrößerung die Pipette und den Kochsalztropfen im Hellfeld ein, schließen dann die Zentralblende des Kondensors und verfolgen die weiteren Vorgänge, das Saugen der Pipette und die Isolierung aus dem Kulturtropfen, im Dunkelfeld.

Wie *Schouten* angegeben hat, suchen wir den Rand des Tropfens aus, wo die Bakterien in einer Schicht am meisten isoliert nebeneinander liegen (Abb. 4). Hier wählen wir ein Bacterium aus, führen die Pipetten-

A



B

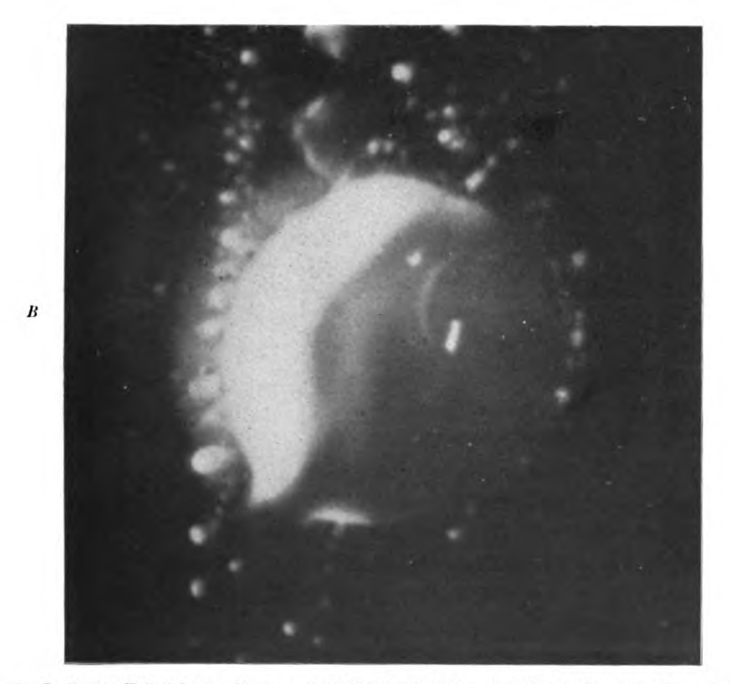


Abb. 5. Isoliertes Tröpfchen mit einer dreigliedrigen Kette und einem einzelnen Pneumokokkus. Das Bild ist auf die Kette fokusiert, der einzelne Kokkus liegt oberhalb dieser optischen Ebene in der Nähe des linken, überstrahlten Randes. Um das Tröpfchen herum sind Kondens-Wassertröpfchen am Deckglas sichtbar. Vergr. Zeiss Obj. Apochr. 8 mm. Phoku (130fach). *B* ist das photographisch vergrößerte Bild von *A*.

mündung genau unterhalb desselben hin, und heben dann die Mündung so, daß das betreffende Bacterium in die Mündung eingefaßt wird. Fast momentan erfolgt nun durch die Capillarwirkung der Pipette das Ansaugen. Sehr rasch muß daraufhin die Mündung wieder

gesenkt werden, sonst strömt eine große Anzahl von Bakterien in die Pipette. Das gute Gelingen der Manipulation hängt eben von der Übung ab, mit der man das einzelne Objekt rasch genug abfangen kann, ohne mehrere gleichzeitig einzusaugen. Je stärker die Bakterienaufschwemmung verdünnt ist, d. h. je zerstreuter die Bakterien im Tropfen liegen, um so sicherer wird sich ein einzelner herauspipettieren lassen. Versucht man aber Bakterien aus der Mitte des Tropfens, wo sie in mehreren Schichten übereinander liegen, zu isolieren, so wird man stets eine große Anzahl derselben einsaugen, da die Pipettenmündung mehrere Schichten von Bakterien durchdringen muß, bis sie das eingestellte erreicht.

Hat man den Eindruck, daß die Pipettierung eines einzelnen Keimes gelungen ist, so stellt man eine trockene Stelle des Deckglases in das Sehfeld ein und bläst aus der Pipette langsam ein kleines Tröpfchen hinaus[1]). Das Tröpfchen darf weder zu klein noch zu groß sein. Kleine und kleinste Tröpfchen reflektieren im Dunkelfeld so stark, daß man in ihnen nichts wahrnehmen kann. Zu große Tropfen sind zwar in optischer Hinsicht viel geeigneter, haben aber den Nachteil, daß sie weniger gut übersichtlich sind, um mit Sicherheit festzustellen, ob sie tatsächlich nur *ein* Bacterium oder Keime in der gewünschten Anzahl enthalten.

Es ist daher ratsam, ein Tröpfchen mit der Pipette auszublasen, das etwa der Größe des Gesichtsfeldes entspricht, wobei seine Ränder noch im Sehfeld sichtbar sind. Auch diese Tröpfchen dürften kaum den Anforderungen einer guten Dunkelfeldbeleuchtung vollkommen entsprechen; immerhin lassen sich die darin befindlichen Bakterien bei einer Art von schiefer Beleuchtung mit der nötigen Deutlichkeit wahrnehmen (Abb. 5). In den meisten Fällen wird dieser erste Tropfen noch mehrere Bakterien enthalten. Es ist aber nunmehr ein leichtes, aus ihm ein einziges Bacterium mit voller Sicherheit herauszupipettieren und in einen zweiten Tropfen auszublasen.

Das so isolierte Bacterium kann nun entweder zur *Ein-Zell-Kultur* oder zur *Tierimpfung* verwendet werden.

Will man *Ein-Zell-Kulturen* anlegen, so saugt man das den einzelnen Keim enthaltende Tröpfchen mit der Pipette ab, entfernt das Deckglas von der feuchten Kammer, legt an seine Stelle ein frisches Deckglas, das vorher mit dem nötigen Nährbodentropfen beschickt worden war, und bläst den Inhalt der Pipette in diesen Tropfen aus. Dies Deckglas kann nun entweder auf einen hohlgeschliffenen Objektträger in der üblichen Weise gesetzt werden oder, wenn man das Wachstum der Ein-Zell-Kultur kontinuierlich beobachten will, in der Feuchtkammer selbst, unter ein in einem Heizschrank befindlichen Mikroskop eingestellt werden.

[1]) Ausführliche Beschreibung der Technik siehe bei *Péterfi*, a. a. O.

Es dürfte überflüssig erscheinen, zu betonen, daß bei all den Versuchen, bei denen das isolierte Bacterium weitergezüchtet werden soll, unter streng sterilen Kautelen gearbeitet werden muß. Bei der eigenen Art der mikrurgischen Arbeit ist es aber doch angezeigt, einiges über die Bedingungen der sterilen Ausführung der Manipulation zu erwähnen. Die einfachste und doch zweckmäßigste Art der Deckglassterilisierung wurde schon oben angegeben. Sicherlich spielt bei unseren Arbeiten die Keimfreiheit des Deckglases bei weitem die wichtigste Rolle. Da die Instrumente, die bei den Manipulationen in Betracht kommen, in der Flamme hergestellt und gleich nachher in den Mikromanipulator eingespannt werden, braucht man sie nicht weiter zu sterilisieren. Auch die Sterilisierung der feuchten Kammer läßt sich einfach durchführen. Man hält sie vor der Manipulation einige Zeit in Alkohol, trocknet sie dann etwas ab und zieht sie ein paarmal durch die Gasflamme.

Will man mit dem einzelisolierten Keim eine *Tierimpfung* vornehmen, was — soweit uns aus der Literatur bekannt — hier zum ersten Male mit der gleich zu schildernden Methodik von uns mit voller Sicherheit ausgeführt wurde, so verfährt man folgendermaßen: Hat man sich davon überzeugt (siehe oben), daß tatsächlich nur ein einziges Bacterium (bzw. Bakterien in der gewünschten Anzahl) isoliert wurde, so saugt man den Tropfen, der den Keim (oder die Keime) enthält, mit der Pipette wieder ab, hebt die ganze Pipette aus dem Mikromanipulator hinaus, führt den Endteil in eine vorher angebrachte Schnittwunde des Versuchstieres, und bricht ihn mit einem leichten Druck subcutan oder intraperitoneal ab. Die Wunde wird entweder mit einer feinen Naht geschlossen, oder in irgendeiner Weise (z. B. mit Leukoplast oder Collodium) abgedichtet.

So ist es uns gelungen, in einer großen Anzahl von Fällen mit einem einzelnen oder mit einer bestimmten Menge von Pneumokokken weiße Mäuse zu infizieren, worüber in einer weiteren Mitteilung berichtet werden wird.

(Aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie, Frankfurt a. M.
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. *W. Kolle*.)

Über die Fraktionierung des hämolytischen Amboceptorserums.

Von

K. Laubenheimer und **Hildegard Vollmar**,
Mitglied des Instituts, Volontärassistentin.

Schon bald nach der Entdeckung der Antitoxine durch *v. Behring* und seine Mitarbeiter *Kitasato* und *Wernicke* setzten Versuche ein, diese und andere inzwischen gefundene Antikörper (Bakteriolysine, Hämolysine, Agglutinine, Präcipitine usw.) aus den Immunseren rein zu gewinnen und ihre chemische Natur zu erforschen. (*Brieger* und *Ehrlich*, *Aronson*). Alle darauf gerichteten Versuche führten jedoch bisher nicht zu dem erstrebten Ziel, da es noch nicht gelungen ist, einen Antikörper isoliert, d. h. frei von Eiweißbestandteilen des Serums, darzustellen. *Die chemische Struktur der Antikörper ist deshalb auch heute noch unbekannt.*

Immerhin haben die bisherigen Versuche ergeben, daß die Antikörper, denen vielfach vergleichsweise ein fermentartiger Charakter mit streng spezifischer Wirkung zugeschrieben wird, durch Fraktionierungsmethoden zusammen mit bestimmten Proteinfraktionen des Serums ausgefällt und auf diese Weise angereichert werden können, wobei das Serumalbumin sich stets frei von Antikörpern zeigte, während die Globulinfraktion sich als Träger der spezifischen Wirkung erwies. Nach *Hofmeister* und seinen Schülern läßt sich der Globulinanteil des Serums durch fraktionierte Ausfällung mit Ammoniumsulfat in das Fibrinoglobulin, Pseudo- (od. Para-) Globulin und Euglobulin trennen. Auch das Fibrinoglobulin zeigte sich frei von Antikörpern, so daß nach der Trennung der verschiedenen Eiweißfraktionen als Träger der Antikörper nur noch das Para- und das Euglobulin übrigbleiben. An welchem von diesen beiden Serumteilen die Antikörper haften, oder ob sie sich auf das Para- und das Euglobulin verteilen, ließ sich mit den bisherigen Methoden nicht mit Sicherheit bestimmen. Auch die Frage, ob die verschiedenen Antikörper sich in dieser Hinsicht gleich verhalten, blieb noch offen.

Nach Versuchen von *Pick*[1]) konnte es auch den Anschein haben, daß bei der Verteilung der Antikörper auf die Serumfraktionen bei verschiedenen Tier-

arten Unterschiede bestehen. *Pick* fand nämlich bei der Fällung von Tetanus-Pferdeimmunserum mit Ammonsulfat das Euglobulin frei von Heilwirkung, während das gesamte Antitoxin mit dem Pseudoglobulin ausfiel. Bei Fällung von Serum gegen Diphtherie immunisierter Ziegen war dagegen das Pseudoglobulin völlig unwirksam und das Antitoxin fand sich an dem ausgefällten Euglobulin. Nach *Fuhrmann*[2]) haftet der hämolytische Immunkörper am Euglobulin *und* Paraglobulin, nicht aber an der Albuminfraktion. *Friedberger* und *Goretti*[3]) sahen bei Dialyse und CO_2-Fällung gleichfalls den Amboceptor am Globulinanteil (Para- und Euglobulin) haften, jedoch zeigte in ihren Versuchen auch noch das Albumin einen Rest der hämolytischen Wirksamkeit, wie die genannten Autoren selbst angeben, wohl deshalb, weil die angewandten Trennungsverfahren nur eine unvollständige Abscheidung der Globuline herbeiführen.

Die bisher angeführten Versuche (genauere Literatur siehe *Kolle-Wassermann* 2. Aufl., Bd. 21, *Kraus-Levaditi*, Immunitätsforschung und *Stern*[4]), die mit den gebräuchlichen Methoden — der Dialyse, der Salzfraktionierung und der Ansäuerung wasserverdünnter Sera — angestellt wurden, führten also zu widersprechenden Ergebnissen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß die genannten Methoden zu einer scharfen Trennung der einzelnen Proteinfraktionen, besonders des Paraglobulins und Euglobulins, nicht ausreichen und somit nicht geeignet sind, festzustellen, welche von den verschiedenen Serumbestandteilen Träger der biologisch wirksamen Körper des Immunserums ist.

Auch wir haben uns in unseren Versuchen zunächst jener Methoden bedient, um uns selbst ein Urteil über die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit zu bilden und wir sind dabei zu der Überzeugung gekommen, daß ihnen lediglich ein orientierender Wert zukommt. Eine *quantitative* Abtrennung der Euglobulinfraktion gelingt mit ihnen nicht. Die Grenzen der Ammonsulfatfällung sind unscharf und auch die Dialyse liefert selbst bei sehr langer Dauer (durch die überdies auch bei sorgfältiger Behandlung die Proteine Veränderungen erleiden, vgl. *Reitstoetter*[5]), keine quantitative Ausbeute.

Bessere Erfolge versprechen neuere Methoden, die durch eine rasche und restlose Entsalzung des Serums das Euglobulin quantitativ abzuscheiden gestatten, wie es mit der *Elektroosmose* und der von *Bechhold* und *Rosenberg*[6] angegebenen *Elektroultrafiltration* möglich ist.

Bei Anwendung des Elektroosmose-Verfahrens fanden *Ruppel* und seine *Mitarbeiter*[7]), daß die Agglutinine und Präcipitine überwiegend dem Euglobulin, in geringerer Menge dem Paraglobulin anhaften. Die komplementbindende Fähigkeit der Sera, auch der Luetikersera, fand sich ausschließlich an die Euglobulinfraktion gebunden, während Albumin und Paraglobulin Komplement nicht zu verankern vermochten. Der hämolytische Amboceptor ließ sich ausschließlich in der Paraglobulinfraktion des hämolytischen Serums nachweisen. Ein gleiches Verhalten zeigten die bakteriolytischen Amboceptoren. Das Antitoxin in Diphtherie und Tetanusserum fand sich zum größten Teil mit dem Paraglobulin vergesellschaftet. Das Euglobulin wies höchstens 12—15% des Antitoxingehaltes auf, das Albumin war frei von Antitoxin. Nach *Ruppel* und seinen *Mitarbeitern*

(l. c.) sind diese Verhältnisse allerdings nur bei frischen Seren konstant, da mit dem Lagern der Sera eine Verschiebung der Proteinfraktionen in der Weise eintreten soll, daß eine Umwandlung von Albumin über Paraglobulin in Euglobulin stattfindet, wodurch nach den genannten Autoren die spontane Abschwächung des Antitoxingehaltes eines Serums zu erklären wäre.

Otto und *Sukiennikowa*[8]) konnten bei Anwendung der elektroosmotischen Spaltung des Serums die Angaben von *Ruppel* und seinen Mitarbeitern nicht bestätigen. Sie fanden vielmehr den hämolytischen Amboceptor in der Hauptsache in der Euglobulinfraktion, in geringerer Menge in der Paraglobulinfraktion. *Stern*[4]) fand in Übereinstimmung mit *Ruppel* und seinen Mitarbeitern (l. c.), daß sich das wirksame Prinzip der Wassermannschen Reaktion nur am Euglobulin findet.

Die *Elektro-Ultrafiltrations-Methode* nach *Bechhold* und *Rosenberg* ermöglicht ebenso wie die Elektroosmose auf sehr schonende und schnelle Weise eine Entsalzung des Serums und damit eine Trennung der lyophilen und lyophoben Proteinfraktionen. Da die Elektro-Ultrafiltration vor der Elektroosmose nicht unbedeutende Vorteile bietet [*Heymann*[9])], schien sie uns besonders geeignet zu sein, die Frage zu studieren, ob es mit ihrer Hilfe gelingt, eine scharfe Trennung der Eiweißfraktionen herbeizuführen und festzustellen, mit welchem Proteinbestandteil die Immunkörper ausgeschieden werden*).

Nachdem wir uns an normalem Pferdeserum überzeugt hatten, daß es mit der Elektro-Ultrafiltration möglich ist, auf einfachste Weise eine quantitative Ausfällung des Euglobulins herbeizuführen, dehnten wir unsere Versuche auf Hammelblut-Kaninchen-Immunserum aus, um festzustellen, an welcher Eiweißfraktion der leicht nachweisbare Amboceptor gebunden ist.

Ehe wir über unsere mit der Elektro-Ultrafiltration erhaltenen Ergebnisse berichten, geben wir zunächst unsere Versuche mit Dialyse und Ammonsulfatfällung wieder.

a) Dialyse allein.

Der Amboceptor (Kaninchenimmunserum) wird in einer Pergamenthülse gegen Aqua dest. langdauernd dialysiert (14 Tage). Das sich durch Salzverarmung abscheidende Euglobulin wird durch Zentrifugieren vom Filtrat (Paraglobulin und Albumin) getrennt und in Normosallösung gelöst. Die Lösung ist eine vollständige.

b) Fällung der Globuline durch Ammonsulfat.

1. Zuerst erfolgt $^1/_3$-Sättigung mit Ammonsulfat: es fällt die Hauptmenge des Euglobulins im Niederschlag aus. Sodann wird der Sättigungsgrad auf $^1/_2$ gebracht: es fällt der Rest des Euglobulins und das

*) Herrn Dr. *E. Strauss* vom Georg Speyer-Haus sind wir für den Hinweis auf die Anwendungsmöglichkeit der Elektroultrafiltration und für seinen Rat bei der Ausführung der Versuche zu Dank verpflichtet. Ebenso danken wir Herrn Prof. *Bechold* für die Überlassung der Apparatur für diese Versuche und für die Ratschläge, mit denen er und sein Assistent, Herr Dr. *Heymann*, unsere Arbeiten unterstützte.

Paraglobulin aus. Die Ammonsalze werden aus den Lösungen der Niederschläge durch Dialyse entfernt; man dialysiert so lange, bis die Nesslerprobe im Innenwasser negativ ist.

2. Bei sofortiger $^1/_2$-Sättigung mit Ammonsulfat fallen Euglobulin und Paraglobulin zusammen aus. Das Filtrat enthält nur noch das Albumin. Der Gesamtglobulinniederschlag wird in möglichst wenig dest. Wasser gelöst und die Lösung dialysiert; nach völliger Salzverarmung scheidet sich das Euglobulin ab. (Dasselbe gilt für die Euglobulinlösung, 1. Fraktion, unter 1.)

c) Fällung der Globuline nach Reye.

Prinzipiell wie bei 2.

Die Methode der Globulinfällung nach *Reye* besteht darin, daß man zuerst das zu fraktionierende Serum mit dest. Wasser im Verhältnis von 2:5 verdünnt. Diese Verdünnung wird mit 3 Teilen konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt und nach 24stündigem Stehen filtriert. Durch Hinzufügung von weiteren 4 Teilen der Ammonsulfatlösung erreicht man die Halbsättigung und damit den Ausfall der Gesamtglobuline; dieser Niederschlag wird ebenfalls durch erschöpfende Dialyse in Euglobulin und Paraglobulinlösung zerlegt. Zweck dieser Methode ist die Gewinnung der Globuline in möglichster Reinheit, frei von Fibrinoglobulin. Das Albumin wird aus dem salzhaltigen globulinfreien Filtrat durch Ansäuern mit verdünnter Essigsäure ausgefällt, abfiltriert, in möglichst wenig dest. Wasser gelöst und dialysiert.

Die Lösung des mit dest. Wasser gewaschenen Euglobulins erfolgte in Normosallösung, und zwar in einer Menge, die der ursprünglichen Amboceptorserummenge entsprach. Das Filtrat wiederum wurde mit soviel NaCl-Lösung besalzen, daß die Konzentration der physiologischen NaCl-Lösung erreicht wurde (0,85%).

Das Euglobulin sowohl wie das Filtrat wurde dann im Hämolyseversuch auf seine hämolytische Wirkung geprüft und dabei mit dem Ausgangsamboceptor verglichen. Die Versuche wurden mit 2 verschiedenen Amboceptoren, beide mit dem Titer 1:1500 angestellt. Die Ergebnisse der Prüfungen der einzelnen Eiweißfraktionen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Vers.-Nr.		Euglobulin Titer	Rest-Euglob. u. Paraglobul. Titer	Albumin Titer	Amboceptorvergleich Titer
19	*Dialyse allein*	1 : 1000	1 : 400	0	1 : 1500
25	*Ammonsulfat-Fällung*	1 : 1000	1 : 500	0	1 : 1500
31	*Ammonsulfat-Fällung*	?	1 : 500	0	1 : 1500
33	*Ammonsulfat-Fällung*	1 : 1000	1 : 500	0	1 : 1500
36	*Ammonsulfat-Fällung n. Reye*	1 : 800	1 : 300	0	1 : 1500

Aus den Versuchen geht also hervor: *Weder das durch Dialyse noch das durch Ammonsulfatfällung gewonnene Euglobulin besitzt die volle*

hämolytische Wirkung des Ausgangsamboceptors. Eine Prüfung des Filtrats (Rest-Euglobul. und Paraglobul.) zeigt, daß ein, wenn auch geringerer Teil des Amboceptors noch in diesem Globulinanteil zurückgeblieben ist.

Wir sind nun zu der *Elektro-Ultrafiltrations-Methode* von *Bechhold-Rosenberg* übergegangen.

Das Prinzip der Methode ist nach *Bechhold-Rosenberg*[6]) folgendes: Durch elektrischen Gleichstrom wird eine Überführung der Ionen, eine Beschleunigung der Trennung des Wassers von den Kolloiden und die Wasserbewegung nach einer oder beiden Elektroden erzielt. Durch die mittels Elektro-Ultrafiltration erreichte völlige Salzverarmung des Serums muß eine quantitative Ausscheidung des Euglobulins erfolgen.

Zu unserer Versuchsanordnung ist noch zu bemerken: 25 ccm des zu untersuchenden Kaninchenserums wurden mit Aq. dest. auf ein Volumen von 100 ccm gebracht (= 1 : 4). Zu Anfang des Versuches befand sich die Kathode außen, d. h. an dem an der Außenseite der Filterschale aufgezeichneten Platinnetz, das als Elektrode dient. Die Stromzufuhr erfolgte unter vorsichtiger Beachtung der in der Filtrationsflüssigkeit herrschenden Temperatur. Diese ließen wir in keinem Falle höher als bis ca. 30° ansteigen. Deshalb wurde zu Anfang eine Spannung von 40 Volt nicht überschritten, und erst, nachdem die Ampèrezahl von anfänglich 0,5 Ampère auf 0,1 gesunken war, wurde die Stromzufuhr bis zur vollen Netzspannung (120 Volt) gesteigert. Der Versuch galt als beendet, wenn der Stromdurchgang = 0 wurde, d. h. wenn der Punkt erreicht war, der völlige Salzfreiheit und damit die quantitative Abscheidung des Euglobulins anzeigte. Praktisch wartet man noch etwa eine halbe Stunde, ehe man den Strom ausschaltet. Gegen Ende der Elektro-Ultrafiltration wurde die Stromrichtung gewechselt, so daß also dann die Anode außen lag. Sobald sich saure Reaktion und zwar $p_H = 6{,}5$ einstellte, trat die Abscheidung des Euglobulins ein [s. auch *Ettich* und *Schick*[10])].

Das Euglobulin schied sich als weißer, flockiger Niederschlag ab, wenn die Anode außen lag, dagegen als gallertiger Belag an der Wand des Ballonfilters, wenn die Kathode sich außen befindet. (Beim Zentrifugieren nahmen auch die Flocken gallertige Beschaffenheit an.)

Das Euglobulin wurde mit Aq. dest. gewaschen, abzentrifugiert und dann in Normosallösung in der der Ausgangsmenge des Serums entsprechenden Menge gelöst. *Das Filtrat* wurde, nachdem es durch einfache Ultrafiltration ohne Stromdurchleitung auf das Ausgangsvolumen eingeengt war, besalzen (0,85%), und sowohl die Euglobulinlösung als auch das Filtrat zwecks Konservierung mit 5 proz. Carbolglycerin (8: 100) versetzt.

In folgender Tabelle geben wir die Resultate wieder.

Prüfung des Euglobulins und des Filtrats auf ihre hämolytische Kraft.

Vers.-Nr.		Euglobulin	Amboceptor-vergleich	Filtrat
52	Titer	1 : 3000	1 : 3000	0
54	Titer	1 : 1500	1 : 1500	0
56	Titer	1 : 2000	1 : 2000	0
60	Titer	1 : 2000 nach 4 Tagen (s. unten)	1 : 3000	0

Die Prüfung des Filtrates auf die verschiedenen Eiweißfraktionen ergab:
Filtrat + $^1/_3$ Ammonsulfat . . . Euglobulin = 0,
Filtrat + $^1/_2$ Ammonsulfat . . . Euglobulin = 0, Pseudoglobulin = ++,
Filtrat + Essigsäure . . . . . . Albumin = ++ .

Eine getrennte Prüfung der Eiweißfraktionen des Filtrates (Paraglobulin und Albumin) auf Hämolyse erübrigte sich, da, wie sich herausstellte, *das Filtrat als Ganzes überhaupt keine hämolytische Wirkung aufwies*, d. h. daß dem darin enthaltenen Paraglobulin keine Hämolysine anhafteten, ebenso wenig wie dem Albumin, wie ja bereits unsere oben mitgeteilten Versuche mit Dialyse und Salzfällung ergeben hatten.

Unsere Untersuchungen mit Elektro-Ultrafiltration zeigten also im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Ruppel* und seinen Mitarbeitern, die sie mit Elektroosmose erhielten, *daß nicht das Paraglobulin, sondern das Euglobulin den Amboceptor quantitativ enthält.*

Trotzdem die Euglobulinlösungen in Normosal mit Carbolglycerin versetzt waren, zeigte sich, daß der hämolytische Titer nach einiger Zeit allmählich zu sinken begann. Es mag das zum Teil seinen Grund darin haben, daß die Normosallösung selbst nicht haltbar ist, andererseits ist aber auch zu bedenken, daß die Euglobulinnormosallösung keine dem Vollserum zu vergleichende Substanz darstellt; die Salzkonzentration stimmt zwar mit der des Serums überein, dagegen ist das Gleichgewicht der Eiweißkörper erheblich gestört, so daß eine im Sinne *Ehrenbergs* als „Ablauf“ zu charakterisierende Reaktion wohl möglich erscheint.

Von diesen Erwägungen ausgehend haben wir das Euglobulin, statt in Normosallösung, in der gleichen Menge des Ausgangsamboceptorserums gelöst. Dadurch ist, abgesehen von der nunmehr verdoppelten wirksamen Euglobulinmenge, die *Struktur des Amboceptorserums als solche gewahrt und das wirksame Prinzip durch das Milieu stabilisiert.*

Die folgende Tabelle zeigt die auf diese Weise erreichte Stabilisierung des angereicherten Amboceptors.

Vers.-Nr.	Euglobulin in Amb. gelöst	Ausgangs-Amboceptor	Alter der Euglobulin-Lösung
70	Titer 1 : 4000	Titer 1 : 2000	1 Tag
71	„ 1 : 4000	„ 1 : 1500	2 Tage
72	„ 1 : 4000	„ 1 : 1500	6 „
73	„ 1 : 3000	„ 1 : 1500	7 „
76	„ 1 : 4000	„ 1 : 2000	15 „
77	„ 1 : 2000	„ 1 : 1000	16 „
78	„ 1 : 2000	„ 1 : 1000	30 „

Bei Verwendung des „Euglobulinamboceptors“ zur *WaR.*, d. h. einer Lösung des isolierten aktiven Euglobulins in Normosal oder in der entsprechenden Menge des Originalimmunserums selbst, zeigte sich, daß völlige Übereinstimmung in der Brauchbarkeit dieser Lösungen

mit derjenigen des Ausgangsamboceptors bestand. Als Gebrauchsdosis für die WaR. ist von dem mit Euglobulin auf doppelte Wirksamkeit angereicherten Amboceptorserum natürlich nur die halbe Menge des ursprünglichen Amboceptors erforderlich.

Weitere Versuche zeigten, daß das angereicherte Amboceptorserum seine streng spezifische Wirkung auf Hammelblutkörperchen voll gewahrt hatte, daß also nur diese, nicht aber Blutkörperchen von Meerschweinchen und Kaninchen hämolysiert werden.

Unsere Versuchsergebnisse zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

Mittels der Elektro-Ultrafiltration gelingt es, aus dem Serum die Euglobulinfraktion quantitativ abzuscheiden. Nur in dieser Fraktion sind die Hämolysine enthalten. Der Paraglobulinanteil und das Albumin erweisen sich als frei von Hämolysinen.

Der mit dem Euglobulin ausgefällte Amboceptor besitzt in bezug auf hämolysierende Wirkung die gleichen Eigenschaften wie das Serum, aus dem er gewonnen wurde.

Der hämolytische Titer des mit dem Euglobulin ausgefällten Amboceptors nimmt bei Wiederlösung des Euglobulins in Normosal mit der Zeit ab, in Serum gelöst bleibt er voll erhalten.

Es gelingt durch Wiederlösen des isolierten Amboceptoreuglobulins in hämolysierendem Immunserum den Titer des letzteren zu verbessern bzw. zu verdoppeln.

Nachdem die Elektro-Ultrafiltration sich für die quantitative Abscheidung des hämolysinführenden Euglobulins bewährt hat, beabsichtigen wir, unsere Versuche mit dieser Methode auch auf andere Antikörper auszudehnen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Pick*, Handbuch der Immunitätsforschung, v. Kraus-Levaditi, Bd. I. S. 331; Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 351, 393, 445. 1902; Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **34**, 556. — [2]) *Fuhrmann*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**. 1903. — [3]) *Friedberger* und *Goretti*. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **2**. 1914. — [4]) *Stern, Rud.*, Biochem. Zeitschr. **144**, 115. 1924; Med. Klinik **20**, 381. 1924. — [5]) *Reitstötter*, Österr. Chemische Ztg. 1922. — [6]) *Bechold* und *Rosenberg*, Biochem. Zeitschr. **157**. 1925. — [7]) *Ruppel, Ornstein, Carl* und *Lasch*, Zeitschr. f. Hyg. **27**, 188. 1923. — [8]) *Otto* und *Sukiennikowa*, Zeitschr. f. Hyg. **101**, 398. 1924. — [9]) *Heymann*, Zeitschr. f. physikal. Chemie **118**, H. 1/2. 1925. — [10]) *Ettisch* und *Schick*, Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 48.

(Aus der Infektionsabteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses. Dirigierender Arzt: Prof. *U. Friedemann.*)

Erfolgt die Antikörperbildung als Reflex oder nach Resorption des Antigens?

Von

Hans Cohn,

ehemaliger Volontärassistent der Infektionsabteilung.

Im Jahre 1921 teilten *Friedberger* und *Oshikawa*[1]) Untersuchungen mit, „wie sich nach parenteraler Zufuhr eines Antigens die Antikörperbildung verhält, wenn das gesamte Antigendepot alsbald wieder beseitigt wird".

Die Vorstellung, von welcher die genannten Forscher ausgingen, war folgende: Wenn die Annahme *Pfeiffers,* daß die Antikörperproduktion als eine *spezifische Sekretion* auf einen *spezifischen Reiz* aufzufassen sei, richtig ist, so kann, nachdem der Reiz einmal eingewirkt hat und die spezifische Sekretion eingeleitet ist, diese auch nach Entfernung des Antigendepots weitergehen.

Die *Versuchstechnik* bestand in der Deponierung einer bestimmten Menge Antigens in der Spitze von Kaninchenohren und in der Abtrennung dieser Ohren nach verschiedenen Zeitabschnitten.

Das unerwartete Ergebnis, zu dem diese Versuche führten, war eine sehr beträchtliche Agglutininbildung, selbst wenn nur $^1/_{100}$ Öse-Bakterienkultur intracutan an einer möglichst blutgefäßarmen Stelle injiziert und das Antigendepot schon 10 Minuten post injectionem wieder entfernt wurde. Das gleiche Verhalten zeigte die *Hämolysin-*[2]) und *Präcipitinbildung*[3]), und *Friedberger* kommt zu dem interessanten Ergebnis, daß „die Entfernung des Antigendepots die Antikörperbildung eher günstig, keinesfalls aber ungünstig beeinflußt".

Reitler[4]) verschärfte — in Anlehnung an die erwähnten Arbeiten — die Versuchsbedingungen, indem er eine Ohrhälfte vor der Injektion bis zur völligen Stauung abschnürte und sofort nach der Injektion mit kurzem Scherenschlag das Ohr abtrennte und kauterisierte.

Da auch bei dieser Technik sowohl Agglutininbildung wie auch Komplementablenkung erzielt werden konnten, so kommt *Reitler* zu der Auffassung, daß die Erregung, welche der Antigenreiz in den ihn percipierenden Zellen setzt, weitergeleitet wird und die Bildung der Antikörper reflexähnlicher Natur sei.

Es lag nun die Frage nahe, welche *Gewebsart* die Leitung des spezifischen Reizes übernimmt und diesen den Stätten der Antikörperproduktion vermittelt. *Reitler* war durch Versuche, bei welchen durch Infiltration mit Anästheticis (Cocain, Pilocarpin, Äther) die nervöse Reizleitung ausgeschaltet war, zu der Ansicht gekommen, daß die spezifische Erregung durch das *nicht nervöse Gewebe* geleitet wird, doch bleibt die Frage offen, *ob* eine bestimmte Gewebsart und *welche* diese Leitung übernimmt.

Dölter und *Kleinschmidt*[5]), die Kaninchen gegen Schweineserum immunisierten, glauben jedoch, im Hämolyse-Hemmungsversuch den Nachweis erbracht zu haben, daß *trotz intensiver Abklemmung* und trotz *rascher Entfernung* des Antigendepots geringe Mengen artfremden Serums *in den Kreislauf übergehen können.*

In Anbetracht der großen theoretischen wie praktischen Bedeutung der Frage nach der Entstehungsweise der Antikörper im Organismus suchten wir diese weiter zu klären, indem wir als empfindlichste Antigen-Antikörperreaktion die *Anaphylaxie des Meerschweinchens* gegen Pferdeserum wählten und folgende Versuchsanordnung trafen:

Einer Anzahl Meerschweinchen wurde eine Extremität vom Rumpf sorgfältig abpräpariert, so daß nur eine schmale Brücke einer bestimmten Gewebsart stehen blieb: Bei einer Serie eine *Hautbrücke*, bei einer zweiten eine *muskuläre*, ferner eine *arterielle*, *venöse*, *ossale* und *nervöse* Verbindung. Sodann wurde in das distale Ende der Extremität 0,2 ccm Pferdeserum intramuskulär injiziert, 2 Minuten gewartet und die Extremität durch Scherenschlag endgültig vom Rumpf getrennt. Die Wunden wurden sorgfältig genäht und verbunden, und die Tiere überstanden in der Mehrzahl den Eingriff gut.

Zu *Kontrollen* (Kontrollen A) dienten *einesteils* Meerschweinchen, welchen nach Durchtrennung der Haut die gleiche Menge Pferdeserum in den Musculus gastrocnomius injiziert und nach der in der Tabelle angegebenen Zeit das entsprechende Bein im Hüftgelenk amputiert wurde.

Ein anderer Teil der Kontrollen (Kontrollen B) wurde in ähnlicher Weise operiert wie die Versuchstiere, jedoch so, daß die Verbindungsbrücke zwischen der amputierten Extremität und dem Körper des Tieres aus *Gewebsverbänden mit wohlerhaltener Zirkulation* bestand, indem *sowohl Muskel als Haut, Knochen, Nerven und Gefäße* — wenn auch in schmaler Brücke — stehen gelassen wurden. Sensibilisierung, Durchtrennung der Verbindungsbrücken und Naht der Wunden erfolgten in der angegebenen Weise.

Nach Ablauf von ca. 4 Wochen wurde das Verhalten der operierten Tiere gegen intravenöse Injektion von 0,1 ccm desselben Pferdeserums geprüft.

Die Resultate gibt folgende Tabelle wieder:

Operiert unter Stehenlassen	Intramuskuläre Injektion von 0,2 ccm Pferdeserum in den distalen Muskelstumpf	Zeitintervall zwischen Injektion und Durchtrennung	Intravenöse Injektion von 0,1 ccm Pferdeserum	Verhalten (anaphylaktisch +) (nichtphylaktisch –)
I. einer Hautbrücke:				
1. Nr. 77	14. VII. 1925	2 Min.	8. VIII. 1925	—
2. „ 78	14. VII. 1925	2 „	8. VIII. 1925	—
II. einer Muskelbrücke:				
1. Nr. 63	28. VII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
2. „ 68	28. VII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
III. einer Knochenbrücke:				
1. Nr. 65	1. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
2. „ 93	1. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
3. „ 98 (*ohne* Periost)	1. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
IV. des N. ischiadicus				
1. Nr. 67	7. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
2. „ 75	7. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	—
V. der Art. femoralis				
1. Nr. 84	8. VIII. 1925	2 „	10. IX. 1925	—
2. „ 86	8. VIII. 1925	2 „	10. IX. 1925	—
VI. der V. femoralis				
1. Nr. 70	24. IX. 1925	2 „	28. X. 1925	+ (tot im Schock)
2. „ 91	24. IX. 1925	1/2 „	28. X. 1925	+ („ „ „)
3. Nr. 97	24. IX. 1925	3 Sek.	28. X. 1925	– („ „ „)
VII. Kontrollen A:				
1. Nr. 54	14. VII. 1925	2 Min.	8. VIII. 1925	+ („ „ „)
2. „ 56	14. VII. 1925	2 „	8. VIII. 1925	+ („ „ „)
3. „ 58	14. VII. 1925	2 „	8. VIII. 1925	+ („ „ „)
4. „ 59	10. VIII. 1925	1 „	6. IX. 1925	+ („ „ „)
5. „ 72	10. VIII. 1925	1 „	6. IX. 1925	+ („ „ „)
VIII. Kontrollen B:				
1. Nr. 69	5. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	+ („ „ „)
2. „ 85	5. VIII. 1925	2 „	9. IX. 1925	+ („ „ „)
3. „ 90	5. VIII. 1925	1 „	9. IX. 1925	+ („ „ „)

Aus dem klaren und eindeutigen Resultat dieser Versuche geht hervor, daß nur, wenn die *Möglichkeit der Resorption* des Antigens auf dem Blutweg gegeben ist, eine *Sensibilisierung erfolgt.* Die Unterbindung und Durchtrennung der Vena femoralis selbst *eine halbe Minute* nach der Injektion des sensibilisierenden Agens *verhindert nicht* den Eintritt des anaphylaktischen Zustandes. Allerdings erweisen sich 3 Sekunden als eine nicht genügende Dauer für sein Zustandekommen. Die schnelle Resorption des Antigens steht im Einklang mit den experimentellen Untersuchungen über die Resorption aus dem Bindegewebe. Nach den bekannten Arbeiten von *Starling* kommt diese bei

der gegebenen Versuchsanordnung durch Filtration zustande, die unter dem Druck der injizierten Flüssigkeitsmenge sicherlich sehr schnell verläuft.

Auf *keinem anderen Wege* gelingt dem Organismus die *Bildung von Antikörpern.* Weder Nerv, Muskel, Haut, Knochen noch Arterie erweisen sich als fähig, die Leitung des anaphylaktischen Reizes zu übernehmen, während die *Kontrollen mit erhaltener Zirkulation sämtlich erfolgreich* sensibilisiert waren.

Das vorliegende Versuchsergebnis spricht also *im Sinne der Resorptionstheorie* und stützt die Ansicht, daß ein *Antigen auf dem Blutweg* zu den *Bildungsstätten der Antikörper* transportiert wird.

Zusammenfassung.

Am Beispiel der Anaphylaxie des Meerschweinchens gegen Pferdeserum wird dargelegt, daß eine *erfolgreiche Sensibilisierung nur bei erhaltener Zirkulation* zustande kommt, d. h. wenn die *Möglichkeit* einer *Resorption* des Antigens gegeben ist. Andere Gewebselemente (Haut, Muskel, Nerv, Knochen oder Arterie) erwiesen sich *nicht imstande, auf dem Wege einer Reizleitung* zu *Antikörperbildung* zu führen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Friedberger* und *Oshikawa*. Beziehungen zwischen Antigen und Antikörperbildung. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., **33**, H. 4—5, S. 306. 1921. — [2]) *Friedberger* und *Tiuti*, Über Antikörperbildung nach Entfernung des Antigendepots. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., **39**, 452. 1924. 2. Mitteilung. — [3]) *Friedberger* und *Huang*, 3. Mitteilung. Ebenda S. 459. — [4]) *Reitler, Rudolf*, Zur Kenntnis der Immunkörperbildung im Organismus. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie **40**, 453. 1924. — [5]) *Dölter* und *Kleinschmidt*, Zur Frage der Antikörperbildung. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie **44**, 531. 1925.

(Aus dem Institut „Robert Koch“.)

Die vaccinale Allergie der Meerschweinchen und ihre praktische Verwertung.

Von
Prof. **H. A. Gins.**

Wir haben uns daran gewöhnt, den Begriff der vaccinalen Allergie vorwiegend in Verbindung mit *von Pirquets* klinischen Studien zu betrachten und sind leicht geneigt, zu übersehen, daß es sich bei der zugrunde liegenden Erscheinung um eine seit langer Zeit bekannte Abart des Verlaufes der Vaccination handelt. Die uns jetzt unter dem Namen „Allergie“ geläufige Erscheinungsform war den Vaccinatoren bereits frühzeitig bekannt und sie brachten sie etwa seit 1820, ganz übereinstimmend mit den heutigen Anschauungen, mit der verschwundenen oder verminderten Empfänglichkeit für das Variolavirus in Verbindung. Die ältere Literatur des 19. Jahrhunderts enthält die Beschreibung der vaccinalen Frühreaktion so deutlich, daß es nicht nötig ist, im einzelnen darauf einzugehen. Es dürfte der Hinweis genügen, daß *Schenck* im Jahre 1844, *Eimer* 1853 und *Bohn* in seinem Handbuch der Vaccination 1875 unverkennbare Beschreibungen geben.

Die Einschätzung der vaccinalen Frühreaktion war zu verschiedenen Zeiten sehr verschieden. *Bohn* sieht in ihr im wesentlichen das Zeichen für einen ungenügenden Impferfolg, der aber für den Geimpften selbst immerhin von Vorteil sein solle. Für das damals ganz auf die humanisierte Vaccine gestellte Impfgeschäft hatten die geringsten Grade des Erfolges schon aus dem Grund geringeres Interesse, weil von ihnen keine Lymphe für weitere Impfungen gewonnen werden konnte. Die Einschätzung der allergischen Reaktion als einer Immunitätsreaktion datiert in dem uns geläufigen Umfang seit den Untersuchungen *von Pirquets*, der damit den Anstoß zu einer Reihe bedeutsamer Fortschritte auf dem Vaccinegebiet gegeben hat. Die Frage der Intensität der Immunität, gemessen an dem Ausfall der Revaccination sei nur nebenbei gestreift und vorwiegend ein anderer praktischer Gesichtspunkt in den Vordergrund gestellt.

Tièche hat als erster gezeigt, daß nicht nur die vaccinale, sondern auch die Variola-Allergie bedeutungsvoll ist. Durch den an seinem Körper geführten Nachweis, daß der vaccine-immune Mensch auf das Variola-Virus allergisch reagiert, hat er einen wichtigen Beitrag zur einheitlichen Auffassung der verschiedenen Pockenarten geliefert, und vor allem hat er gezeigt, daß diese Allergie des vaccine-immunen Menschen für die Diagnose der Variola ausgezeichnet verwendet werden kann. Aus seinen Berichten ergibt sich, daß er mit nur ganz geringen Fehlergrenzen die Differentialdiagnose der Variola gegenüber Varicellen in mehreren hundert Fällen stellen konnte. Eine weitere Verbreitung

seiner Methode ist zweifellos dadurch stark gehemmt worden, daß ein hoch immuner menschlicher Körper für das Gelingen seines diagnostischen Versuches Vorbedingung ist. Es ist begreiflich, daß die absichtliche Übertragung von Pustelinhalt verdächtiger Erkrankungen auf die Haut eines gesunden Menschen nicht ohne weiteres zu einer allgemeinen Methode werden konnte; denn es droht die Gefahr einer Infektion mit anderem Virus, wenn Pustelinhalt klinisch unklarer Fälle zur Verimpfung kommen soll. *Tièche* selbst schließt einen großen Teil der Gefahren für seine Person dadurch aus, daß er den Pustelinhalt vor der Verimpfung auf etwa 60° C erhitzt. Die Syphilisspirochäten werden auf diese Weise voraussichtlich unschädlich gemacht. Ob dies jedoch bei allen Eitererregern der Fall ist, läßt sich nicht bestimmt sagen. Die persönlichen Erfahrungen *Tièches* und seiner anderen Versuchspersonen sprechen wohl dafür, daß das Risiko einer „Impfschädigung" nicht groß sein kann; denn es sind bisher noch keine unangenehmen Zwischenfälle beobachtet worden. Immerhin aber wäre es wünschenswert, auch die geringste Möglichkeit einer Infektion von Versuchspersonen auszuschalten, und das dürfte nur gelingen, wenn an Stelle des „Versuchsmenschen" ein Versuchstier tritt.

Bestrebungen nach dieser Richtung sind aus Amerika zu melden, haben aber augenscheinlich nicht zu befriedigenden Ergebnissen geführt; denn die gleich zu beschreibende Methode hat keine allgemeine Anerkennung gefunden. *Force* und *Beckwith* haben versucht, die Methode von *Tièche* an immunisierten Kaninchen und Meerschweinchen nachzuahmen. Sie gingen folgendermaßen vor: Kaninchen oder Meerschweinchen wurden durch subcutane Verimpfung von Glycerinvaccine immunisiert und dann in der Art als Testtiere verwendet, daß Aufschwemmungen des zu untersuchenden Pustelinhaltes *intracutan* in Mengen von 0,05—0,1 eingespritzt wurden. Die allergische Reaktion sollte nach 24 Stunden zum Ablesen bereit sein und sich als schnell aufschießende Quaddel mit deutlicher Randröte zeigen. Nach den Angaben und Protokollen der beiden Autoren scheinen bei Kaninchen zutreffende Resultate erhalten worden zu sein, während bei Meerschweinchen die Ergebnisse anscheinend nicht so befriedigend waren; denn es sind nur ganz wenige derartige Versuche erwähnt. Schon unmittelbar nach dem Vortrag der beiden Autoren sind in der Diskussion eine Reihe von Einwänden gemacht worden, die sich unter anderem auch auf die Ausschaltungen von unspezifischen Hautreaktionen bezogen. Ich habe diese Methode bald nachdem ich davon Kenntnis erhielt, nachgeprüft und keine aufmunternden Ergebnisse erhalten. Das war auch der Grund, warum die seinerzeit — ausweislich meiner Protokolle in den Monaten August bis Dezember 1916 — erzielten Resultate nicht veröffentlicht worden sind. Es wurde damals wie folgt verfahren: 5 Kaninchen waren im August mit Glycerinlymphe immunisiert worden. Im Oktober wurde die Immunität durch erneute Hautimpfung geprüft. Im November und Dezember wurde dann die *intracutane* Impfung mit folgenden Materialien gemacht:

1. Glycerinlymphe $^{1}/_{200}$;
2. Pustelinhalt von Pockenverdächtigen;
3. Pockenschorf;
4. Pustelinhalt von Windpocken;
5. 50proz. Glycerinkochsalzlösung als Kontrolle.

Nach 24 Stunden waren an den Injektionsstellen derart verschiedene Reaktionsformen zu sehen, daß an eine Diagnose der einzelnen Reaktion nicht zu denken war. Die mit Varicellenmaterial gespritzten Stellen hatten teilweise das gleiche Aussehen wie die mit Pockenpustelinhalt versehenen Stellen. Einzelne Injektionsstellen zeigten in der Tat eine als spezifisch anerkennbare Reaktionsform, jedoch war kein gleichmäßiges Verhalten innerhalb der einzelnen Materialien vorhanden. Die Versuche wurden aufgegeben, weil keine Hoffnung bestand, zu einer sicheren Pockendiagnose zu kommen. Und die bei uns erhobenen Befunde dürften an anderen Stellen, welche die Methode von *Force* nachprüften, auch festgestellt worden sein; denn das allergische Verfahren am Kaninchen hat sich nicht eingebürgert.

Im Laufe der zwölf Jahre, die das Pockenlaboratorium am Institut besteht, hat sich die Verwendung des Meerschweinchens für die verschiedensten Zweige der Pocken- und Vaccineforschung bestens bewährt. Mit Ausnahme der rein histologischen Arbeiten, die beim Kaninchen bessere Ausbeute geben, ist das Meerschweinchen für alle in Frage kommenden Versuche zu verwenden. Die Immunisierung gelingt auf allen Wegen, bei denen sie auch bei anderen Versuchstieren geht, und ihre Dauer ist anscheinend nicht kürzer als z. B. beim Kaninchen. Wir haben nicht selten Meerschweinchen gesehen, die nach einem Jahre keine merkliche Verminderung der Immunität erkennen ließen. Da das Meerschweinchen eine erheblich dickere Haut hat als das Kaninchen, lag der Gedanke nahe, dieses Organ besonders auf seine Eignung zu Vaccineversuchen zu prüfen. Bei den zahlreichen intracutanen Vaccinationen, die schon seit langer Zeit vorgenommen wurden, stellte sich heraus, daß wohl auf diese Weise die Tiere immunisiert werden können, daß aber die örtliche Reaktion nicht sehr typisch verläuft. Aus diesem Grunde gelang es z. B. nicht, bei dieser Tierart die Virulenzprüfung der Vaccine nach der *Groth*schen Methode mit befriedigendem Resultat durchzuführen. Die Neigung zur Bildung von Infiltraten nach intracutaner Injektion ist augenscheinlich so groß, daß brauchbare spezifische Unterschiede nicht zu fassen sind.

Dagegen gelang es leicht, auf dem Wege der gewöhnlichen Impfschnittmethode zu allergischen Reaktionen zu kommen, die mit den beim Menschen beobachteten sehr große Ähnlichkeit haben. Wir gingen bei den ersten Versuchen so vor, daß auf der rasierten Bauchhaut immuner Meerschweinchen einzelne Impfschnitte angelegt wurden, die mindestens 2 cm voneinander entfernt waren. Da an demselben Tiere mehrere Prüfungen gemacht werden können, wurde eine Impfstelle mit sicher virulenter Vaccine beschickt, eine zweite mit erhitzter Vaccine und eine dritte mit Glycerin-Kochsalzlösung. Das Resultat kann nach 24 Stunden abgelesen werden. Nach dieser Zeit sieht man an der Impfstelle mit virulenter Vaccine eine lebhafte Rötung um den Impfschnitt, wobei gleichzeitig die Wunde etwas angeschwollen erscheint. Die Kontrollstelle ohne Virus zeigt lediglich die im Rück-

gang befindlichen Spuren des Traumas, die Impfstelle mit erhitzter Vaccine reagiert allergisch, aber abhängig von dem verwendeten Temperaturgrad.

Der Verlauf eines solchen Versuches war der folgende:

M 1471 am 30. XII. 1924 vorbehandelt mit 1 ccm Vaccine $^{1}/_{20}$ subcutan.
13. III. 1925 Schnittimpfung am Bauch mit Glycerinvaccine unverdünnt:

	a) 24 Std. bei 37° C	b) 24 Std. bei 58° C	c) 1 Std. bei 80° C
14. III.:	Schwellung	mäßige Schwellung	unverändert
15. III.:	o. B.	o. B.	o. B.

Der Ausfall dieses Versuches läßt daran denken, daß die vollkommene Abtötung des Vaccinevirus auch die Möglichkeit vernichtet, eine allergische Reaktion zu erzielen. Bei welcher Temperatur die allergische Reaktion ganz erlischt, ist im einzelnen noch nicht festgestellt worden.

Weiterhin wurde versucht, durch die Verdünnung des Vaccinevirus einen Überblick darüber zu gewinnen, ob beim Zustandekommen der allergischen Reaktion quantitative Verhältnisse eine wesentliche Rolle spielen. Mehrere Versuche nach dieser Richtung erwiesen, daß schon ziemlich unwesentliche Verdünnungen die allergische Reaktion stark beeinträchtigen. Als Höchstgrenze der Verdünnung wurde bisher 1 : 100 gefunden. Noch weitere Verdünnungen ergaben bisher keine brauchbaren Resultate.

Wenn die Allergie der Meerschweinchen irgendwie brauchbar sein soll, dann muß sich der Nachweis führen lassen, daß diese Reaktion in ausreichendem Maße spezifisch ist, und daß man mit einiger Sicherheit auf gleichmäßige Ergebnisse bei mehreren gleichzeitig geprüften Tieren rechnen kann. Um hierüber Auskunft zu erhalten, wurden 15 Meerschweinchen durch *intracutane* Injektion von frischem Vaccine-Rohstoff immunisiert. Nach 4 Wochen wurde die allergische Reaktion geprüft, und zwar immer gleichzeitig an demselben Tier mit unverdünnter Glycerinlymphe, mit demselben Material, welches eine halbe Stunde auf 80° erhitzt war, und mit frischem Rohstoff, der 5 Tage lang in dünner Schicht an Glasplatten angetrocknet war. Die Reaktion an der Impfstelle mit virulenter Glycerinvaccine war 14 mal glatt positiv, einmal wurde sie als zweifelhaft bezeichnet. Die erhitzte Vaccine gab 11 mal negative Reaktion und 4 mal angedeutet positive Befunde. Dieser Ausfall ist nicht gegen die Spezifität der Reaktion zu verwerten, da eine zweite Durchprüfung der Tiere ergab, daß bei der Verwendung von Glycerin-Kochsalzlösung als Kontrolle niemals eine zweifelhafte Reaktion auftrat. *Der angetrocknete Rohstoff gab in allen Fällen eine deutliche allergische Reaktion.*

Bei einer zweiten Gruppe von Tieren wurde die erste Impfung durch Injektion von Glycerinvaccine in den Hoden gemacht. Die Prüfung wurde ebenfalls nach 4 Wochen vorgenommen, und zwar auch

wieder mit verschieden zubereitetem Material an demselben Tier. Um zu sehen, ob vielleicht von seiten des Hodens eine besondere Reaktion aufträte, wurde in den Hoden der anderen Seite eine geringe Menge (0,2 ccm) einer Lympheverdünnung 1 : 1000 injiziert. Die genauen Ergebnisse sind auf der Tabelle 1 verzeichnet. Die unverdünnte Glycerinlymphe gab bei den in Betracht kommenden Tieren mit einer Ausnahme ein positives Resultat. Die als fraglich zu bezeichnenden Reaktionen haben sich als spezifisch positiv erwiesen, nachdem größere Erfahrung

Tabelle 1. *Die Meerschweinchen wurden durch Injektion verdünnter Glycerinlymphe in den einen Hoden immunisiert. Nach 4 Wochen Schnittimpfung auf der rasierten Bauchhaut mit folgenden Materialien (+ = allergische Rötung, +? = schwache Rötung, — = reaktionslos):*

Meerschweinchen Nr.	a) Unverdünnte Glycerinlymphe	b) Glycerinlymphe 1/2 Std. 80°	c) Angetrockneter Rohstoff	d) Injektion in den anderen Hoden
1560	+	—	+?	Schwellung
1662	+	—	+	,,
1663	+	—	+?	,,
1664	+?	—	+	,,
1665	+	+	+	—
1668	+	—	+	Schwellung
1669	+	—	+?	,,
1671	+?	—	+?	,,
1672	+	+?	+	,,
1673	+	—	—	,,
1674	—	—	—	—
1675	+	—	+?	Schwellung
1676	+	—	+	,,
1677	+	—	+?	,,
1678	+	—	+?	,,

in der Beurteilung dieser Reaktion erworben war. Die abgetötete Vaccine ergab bei einem Tier noch eine fragliche Reaktion, die wahrscheinlich anzeigt, daß noch Reste des Antigens in lebendem oder, besser gesagt, in reaktionsbereitem Zustand vorhanden waren. Die Reaktionen bei den Impfstellen mit angetrocknetem Rohstoff waren bei dieser Serie nicht so eindeutig wie bei der vorhergehenden und bei der folgenden. Es darf hieraus vielleicht geschlossen werden, daß die Immunisierung vom Hoden aus doch nicht so gute Vorbedingungen für die Hautallergie schafft wie diejenige von der Haut aus.

Der größte Teil dieser Tiere reagierte auf die neuerliche Hodeninjektion mit einer Schwellung dieses Organs nach 24 Stunden. Bei den noch nicht genügend zahlreichen Beobachtungen und wegen des Fehlens von Vergleichsmaterial kann hieraus noch nicht auf eine im Hodengewebe sich abspielende Organallergie geschlossen werden. Hier müssen weitere Versuche die Aufklärung bringen.

Die letzte Serie vorbehandelter Tiere umfaßt diejenigen Meerschweinchen, welche durch subcutane Injektion von Glycerinlymphe immunisiert worden waren. Es überlebten von dieser Reihe 18 Tiere. Wie die Tabelle 2 zeigt, ist bei ihnen entschieden ein höherer Grad von Allergie erzielt worden. Zwar sind bei der ersten Prüfung 3 Tiere ausgefallen, die entweder gar nicht oder nur mangelhaft allergisch reagiert hatten, aber bei einer zweiten Prüfung waren 2 von ihnen hoch allergisch, während das letzte nicht geprüft wurde. Die Spezifität der Allergie kommt aber bei dieser Gruppe sehr deutlich zum Ausdruck.

Tabelle 2. *Die Meerschweinchen wurden durch subcutane Injektion von verdünnter Glycerinlymphe immunisiert. Die Allergieprüfung geschah nach einigen Wochen mit folgenden Materialien (Zeichen wie in Tab. 1.):*

Meerschweinchen Nr.	a) Unverdünnte Glycerinlymphe	b) Glycerinlymphe $^1/_2$ Std. 80°	c) Angetrockneter Rohstoff	d) Glycerin-Kochsalzlösung 50%
1579	+?	+?	+?	—
1580	+?	+?	+	—
1581	+	+	+	—
1582	+	—	++	—
1583	— (++)	— (+)	—	— (—)
1584	— (++)	—	+	— (—)
1585	+	+	+	—
1586	+	—	++	—
1587	+	—	+	—
1588	+	+	++	—
1589	+	—	+	—
1591	— (++)	—	+	— (—)
1592	+	—	+	—
1593	+	+?	++	—
1594	+	+?	++	—
1595	+	+?	++	—
1596	+	+?	++	—
1597	+	—	+	—

Die Zeichen in der Klammer geben das Resultat einer zweiten Prüfung kurze Zeit nach der ersten an.

Die Impfstelle mit Glycerinwasser war stets einwandfrei negativ, während die Virusverimpfungen sehr deutliche allergische Reaktion zeigten. Besonders deutlich waren bei dieser Reihe die Allergiereaktionen mit angetrocknetem Rohstoff ausgefallen. Dieses Material war gewählt worden, um einige Unterlagen für die Möglichkeit der Verwendung eingeschickten Pustelmateriales zu gewinnen. Nach dem sehr guten Ergebnis, welches wir mit der Prüfung des angetrockneten Materiales hatten, ist Aussicht vorhanden, auf dem Wege über die Allergie der vaccineimmunen Meerschweinchen zu einer neuen tierexperimentellen Pockendiagnose zu kommen.

Diese Methode ist neu dadurch, daß für das *Tièche*-Verfahren der menschliche Körper ausgeschaltet und an seiner Stelle das Meerschweinchen verwendet wird. Nach den regelmäßigen Allergiereaktionen, die bei unseren Versuchstieren entstanden, ist damit zu rechnen, daß auch die Verimpfung von Pustelinhalt Pockenkranker eine gleiche Reaktion hervorrufen wird. Hierüber größere Erfahrungen zu sammeln, liegt bei uns die Möglichkeit nicht vor. Da die Pocken fast völlig verschwunden sind, hatten wir bisher nur in 3 Fällen Gelegenheit, Proben von Pustelinhalt, die zu diagnostischen Zwecken eingeschickt waren, zu prüfen. Das Ergebnis in diesen 3 Fällen entsprach jedoch völlig der klinischen Diagnose, trotzdem das Material in dem einen Fall schon über 14 Tage angetrocknet gelegen hatte.

Der 1. Fall betraf die Erkrankung eines Arztes im Rheinland. Die *Paul*sche Reaktion war negativ, aber die allergische Reaktion fiel deutlich positiv aus. Der 2. Fall betraf den isolierten Pockenfall in Berlin, der vor einigen Wochen festgestellt worden war. Hier war ebenfalls die Verimpfung nach *Paul* negativ, während die klinische Diagnose Variola unverändert aufrechterhalten werden mußte. Die Allergieprobe am Meerschweinchen war deutlich positiv. Bei dem 3. Fall handelte es sich um eine pockenverdächtige Erkrankung, die auf Grund des klinischen Verlaufes als Windpockenfall angesehen werden mußte. In diesem Falle stimmte die negative *Paul*sche Reaktion mit der klinischen Diagnose überein, die Allergieprobe war ebenfalls negativ. Wenn auch diese drei ersten Fälle nur eine Bestätigung der klinischen Diagnose darstellten, so geben sie doch Hoffnung, daß es gelingen wird, auch schwieriger zu stellende Diagnosen zu klären. Da die Allergiereaktion nach 24 Stunden schon deutlich ist, kommt eine Verkürzung der experimentellen Diagnose um mindestens einen Tag gegenüber der bisherigen Verfahren in Frage. Die Technik ist einfach, und die Unkosten sind gering, so daß die Ausführung der Reaktion keine Schwierigkeiten macht. Da es sich nicht um eine bereits in der Praxis bewährte Methode handelt, sondern um eine solche, die auf Grund der Laboratoriumserfahrungen Aussicht hat, für die Praxis nutzbar gemacht zu werden, empfehle ich für die Nachprüfung folgendes Vorgehen:

Mindestens 10 weißhäutige Meerschweinchen werden durch subcutane Injektion von Glycerinlymphe oder durch ausgedehnte Hautimpfung mit ganz frischem Vaccinerohstoff immunisiert. Nach 3—4 Wochen ist die genügende Überempfindlichkeit vorhanden. Ehe diagnostische Versuche an den einzelnen Tieren gemacht werden, ist es erforderlich, festzustellen, ob sie eine deutliche allergische Reaktion geben, d. h. ob die durch oberflächliche Schnittimpfung erfolgte Einbringung von virulenter Vaccine zu einer deutlichen Rötung und Schwellung der Impfstelle nach 24 Stunden führt, während die Kontrollstelle mit steriler Glycerin-Kochsalzlösung ganz reizlos bleibt. Für diagnostische Zwecke sollten nur Tiere mit deutlichen Reaktionen verwendet werden.

Die Technik des Impfschnittes scheint nicht ganz ohne Einfluß auf den Ablauf der Reaktion zu sein. Tiefe Schnitte verwischen die Spezifität der Reaktion leicht, sie sollten daher vermieden werden. Am besten haben sich uns Scarifikationen mit der scharfen Impfnadel bewährt, die derart angeordnet werden, daß drei horizontale und drei vertikale Kratzer im Abstand von 2—3 mm gesetzt werden, so daß ein kleines Gitter entsteht. An solchen Impfstellen treten die allergischen Reaktionen sehr deutlich auf, während die Beurteilung der Reaktionen an einzelnen Impfschnitten schon eine gewisse Übung erfordert. Wer sich mit der angegebenen Technik vertraut machen will, wird zweckmäßig eine größere Serie von immunen Meerschweinchen mit Vaccinematerial verschiedener Virulenz (verdünnte und erhitzte Vaccine) prüfen und dann erst zur Verimpfung von Pustelinhalt unbekannter Herkunft übergehen. Die versuchsweise Anwendung des Verfahrens in Ländern, welche über endemische Pocken verfügen, erscheint durchaus gerechtfertigt. Wenn die Arteinheit von Variola- und Vaccinevirus besteht — und es zweifelt jetzt kaum mehr ein Autor daran —, dann ist auf dem Wege der Allergieprüfung eine Pockendiagnose am immunen Meerschweinchen ebenso zu erwarten, wie sie von *Tièche* am Menschen schon einwandfrei erwiesen worden ist. Die experimentelle Grundlage für diese Methode am Tier, nämlich das Auftreten allergischer Reaktionen am vaccineimmunen Meerschweinchen, ist durch unsere Versuche sicher festgestellt.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Schenck, C.*, Die Pocken in allen ihren Beziehungen. Quedlinburg und Leipzig, bei Gottfried Basse 1844. — [2]) *Eimer, Ch.*, Die Blatternkrankheit in pathologischer und sanitätspolizeilicher Hinsicht. Leipzig 1853. — [3]) *v. Pirquet*, Klinische Studien über Vaccination und vaccinale Allergie. Leipzig und Wien 1907, bei Fr. Deuticke. — [4]) *Tièche*, Korrespondenzbl. f. Schweiz. Ärzte 1913; Zentralbl. f. d. ges. Hyg. **10**. 1925. Vers.-Bericht, Tagung der Impfanstaltsvorsteher, Kassel 1924. — [5]) *Force* und *Beckwith*, Journ. of the Americ. med. assoc. **65**, 588. 1915.

(Aus der Abteilung für experimentelle Medizin — Vorstand: Prof. *A. A. Krontowski* — des Bakteriologischen Instituts zu Kiew.)

Beiträge zur experimentellen Pathologie des Fleckfiebers*).

IV. Über die Filtrierbarkeit des Fleckfiebervirus**).

Von

Privatdozent Dr. **I. W. Hach,**

Vorstand der Variola-Vaccineabteilung des Instituts.

Mit 10 Textabbildungen.

Vor einigen Jahren sprachen *da Rocha-Lima*, *Krontowski* und *ich*, als auch *Olitsky*[1]) den Gedanken aus, daß bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse die sicherste — wenn auch bestimmt langsamer zum Ziele führende — Methode zur Erforschung der Ätiologie des Fleckfiebers diejenige ist, welche Schritt für Schritt, systematisch die biologischen Eigenschaften des Fleckfiebervirus studiert, ohne die auf diese Weise festgestellten Tatsachen sofort in bestimmten Zusammenhang mit dem einen oder dem anderen morphologischen Befund zu bringen. Zum Studium der Morphologie des Fleckfiebervirus wird unseres Erachtens der günstigste Zeitpunkt bloß dann eintreten können, wenn wir über eine genügende Anzahl solcher genau geprüfter Tatsachen verfügen werden, welche die Biologie des Virus kennzeichnen.

Ich bin der Meinung, daß dieser Standpunkt auch jetzt noch vollkommen berechtigt ist. Wenn wir schon von dem Durcheinander absehen, welches bis jetzt hinsichtlich der verschiedenen morphologischen Gebilde herrscht, die bei fleckfieberkranken Tieren — Mensch, Affe, Meerschweinchen — als auch bei Fleckfieberlaus beschrieben sind (vgl. z. B. die Ergebnisse von *Hegler* und *Prowazek*, *Kuczynski*, *Walbach*, *Todd* und *Palfry*, *Schnabel* u. a. mit den Untersuchungen von *Weigl*, *Cowdry*, *Woodcock* u. a.), so bleibt die Richtigkeit unseres Standpunktes durch die Geschichte von den durch *Barykin* und *Kritsch*, *Kuczynski* u. a. gewonnenen Reinkulturen zweifellos bekräftigt. Zur Zeit gibt ja *Barykin* selbst zu (s. *Barykin*, *Kompanejetz*, *Sacharoff*, *Barykina* und *Pysin*), daß die von *ihm* und *Kritsch* beschriebene Reinkultur nur eine Kultur der sekundären Infektion vorstellt und in keinerlei Beziehung zur Ätiologie des Fleckfiebers steht; die

*) Die voraufgehenden Mitteilungen sind erschienen: 1. in Zeitschr. f. Hyg. **104**, 319. 1925; 2. in Virchows Archiv **256**, 495. 1925 und 3. in Zeitschr. f. Hyg. **104**, 337. 1925.

**) Vortrag, gehalten auf dem IX. Allrussischen Kongreß für Bakteriologie zu Moskau, den 25. V. bis 1. VI. 1925.

Befunde von *Kuczynski* widersprechen ihrerseits denjenigen von *Abe, Kutejstschikow* u. a. Demtentsprechend müssen auch die Befunde von *Fejgin* noch durch weitere Untersuchungen nachgeprüft werden (vgl. *Otto* und *Munter*).

Zur Zeit sind unsere Kenntnisse der Biologie des Fleckfiebervirus noch bei weitem nicht genügend, und infolgedessen habe ich bei meinen fünfjährigen Untersuchungen über Fleckfieber [*Hach*[1–4])] auch einige Fragen hinsichtlich der biologischen Eigenschaften des Fleckfiebervirus eingeschlossen. Diese Mitteilung soll den Resultaten gelten, welche meine *Versuche über die Filtrierbarkeit* des in den Organen von fleckfieberkranken Meerschweinchen enthaltenen Fleckfiebervirus ergeben haben.

Soweit mir bekannt, ist es keinem von den Autoren, welche die Filtrierbarkeit des Fleckfiebervirus studierten, gelungen, die einwandfreie Erkrankung der mit Filtraten geimpften Tieren nachzuweisen [*Ricketts* und *Wilder*, *Nicolle*, *Conor* und *Conseil*, *Goldberger* und *Anderson*, *Prowazek*, *Prowazek* und *Rocha-Lima*, *Rocha-Lima*, *Nicolle*, *Blanc* und *Conseil*, *Otto* und *Dietrich*, *Olitsky*[2]) [3])].

Etwas abweichend von den Untersuchungen dieser Autoren sind die jüngeren Versuche von *Olitsky*[2]) [3]), welcher als Ausgangsmaterial die Organe von fleckfieberkranken Meerschweinchen gebraucht.

Gesunde Meerschweinchen wurden mit durch die *Berkefeld*sche Kerze gewonnenen Filtraten infiziert, wobei der Autor zwar in keinem einzigen Falle einen typischen Fieberanfall vermerken konnte, jedoch in den Organen einer bedeutenden Anzahl der Versuchstiere typische pathologisch-histologische Veränderungen feststellte. Bei der Immunitätsprobe konnte nachgewiesen werden, daß eine Anzahl, vorhergehend mit Filtraten infizierter Meerschweinchen eine deutlich verminderte Empfänglichkeit Fleckfieber gegenüber aufwiesen. Die Versuche von *Olitsky* mit dem Blute der 4—7—10 Tage vorher mit Filtraten infizierten Meerschweinchen gesunde Tiere zu infizieren, blieben immer erfolglos.

Auf Grund dieser Ergebnisse kommt *Olitsky* zur Überzeugung, daß seine Filtrate lebendes Fleckfiebervirus, das imstande wäre, bei den Meerschweinchen eine aktive Infektion auszulösen, nicht enthielten — doch ist er der Meinung, daß diese Filtrate bestimmte Abbau- oder Lebenstätigkeitsprodukte des Fleckfiebervirus enthalten, welche die Fähigkeit besitzen, bei Meerschweinchen kennzeichnende pathologisch-histologische Veränderungen hervorzurufen und diesen Tieren eine gewisse Immunität zu verleihen.

Meines Erachtens ist die Schlußfolgerung von *Olitsky* im gegebenen Falle nicht die einzig zulässige.

Wie bekannt, können bei fleckfieberkranken Meerschweinchen, wie auch beim Menschen, neben deutlich ausgesprochenen typischen öfters auch unklare, atypische Erkrankungen beobachtet werden. Wenn wir nun aber annehmen wollten, daß bei den Passagemeerschweinchen von *Olitsky* keinerlei klinischen Fleckfiebererscheinungen festgestellt werden konnten, so schließen diese Befunde von *Olitsky* keineswegs die Möglichkeit aus, daß es sich hier bei den mit Filtraten

infizierten Tieren nicht um eine atypische, „inapparente" Infektion handelte [vgl. z. B. *Hach*[2]) [3]) [4])].

In dieser Beziehung können auch negative Resultate bei der Einimpfung von 3 ccm Blut des 4—7—10 Tage vorher mit der im Filtrat enthaltenen — vermutlich sehr kleinen — Virusmenge infizierten Meerschweinchens, meines Erachtens, kaum vollkommen überzeugend wirken, und es läßt sich nicht mit Bestimmtheit behaupten, daß im gegebenen Falle nicht, vielleicht *später* und *mit Organen* (nicht mit Blut) erfolgreiche Passagen gewonnen werden können [vgl. *Landsteiner* und *Hausmann, Doerr* und *Pick*[1]), *Rocha-Lima, Weil* und *Breinl, Otto* und *Munter* u. a.].

Jedenfalls bieten die Ergebnisse von *Olitsky* fraglos ein bedeutendes Interesse sowohl vom Standpunkt der Pathogenese der morphologischen Veränderungen als auch vom Standpunkte des Entstehungsmechanismus aktiver Immunität bei Fleckfieber. Beide Fragen studiere ich schon seit längerer Zeit [*Hach*[1—4])], und daher haben die Mitteilungen von *Olitsky* mit den gestellten Aufgaben eines systematischen Studiums der Biologie des Fleckfiebervirus mich zu nachfolgenden Versuchen bewogen.

Indem ich an die Versuche der Filtration von Fleckfiebervirus trat, hielt ich mich der Meinung, daß es zum Erzielen einwandfreier Resultate gewiß zuallererst durchaus notwendig ist, die Filtration bei solchen Bedingungen auszuführen, daß man die vollkommene Gewißheit hat, daß keinerlei banale Bakterien in das Filtrat gelangen könnten; zugleich muß auch die Gewißheit bestehen, daß die Filtration unbedingt filtrierbarer Vira nicht durch den einen oder anderen technischen Fehler unmöglich gemacht werden kann. Doch achtete ich bei der Ausarbeitung der Methodik meines Versuches hauptsächlich und besonders — auf das sorgfältige und möglichst allseitige Studium der mit Filtraten infizierten Meerschweinchen —, wobei ich immerfort die Möglichkeit einer abgeschwächten, atypischen Erkrankung in Betracht zog.

Als Ausgangsmaterial für meine Versuche benutzte ich die inneren Organe (Milz, Leber, Niere, Nebenniere, Herz, Lunge, Gehirn) von 7 fleckfieberkranken Meerschweinchen der 22.—30. Generation unseres Stammes „Kd", welche am 3.—6. Tage nach Beginn des Fieberanfalls getötet worden waren.

Dieser von mir schon teilweise in früheren Mitteilungen charakterisierte Stamm [*Hach*[1]) [2]) [3])] gehört mit zu unseren besten und gibt bis zur Zeit bei Überimpfungen ca. 95% positive Resultate.

Die Filtration wurde durch die *Chamberland* „F"-Kerze — als technisch zuverlässigste und zugleich am schwersten passierbare — ausgeführt (vgl. *Rosenthal*); dabei wurden alle notwendigen Kontroll- und technischen Vorsichtsmaßnahmen strengstens beobachtet (vgl. *Lipschütz, Rosenthal* u. a.).

Die inneren Organe der durch Chloroform getöteten Meerschweinchen wurden 5—10 Min. nach dem Tode entnommen und in einem Mörser mit gestoßenem Glas sorgfältig verrieben, wobei nach und nach etwas Leitungswasser (vgl. *Lipschütz*) hinzugegeben wurde. Die auf solche Weise erhaltene dicke Aufschwemmung wurde bis zu einem bestimmten Volumen mit Wasser verdünnt (1 g Organe

auf 20 ccm Wasser) und in einen hohen Glaszylinder gegeben, wo binnen 10 bis 15 Min. die größeren Teilchen sich auf den Boden absetzten. Die von diesem Bodensatz abgegossene Flüssigkeit wurde zunächst durch Watte und Papier filtriert und dann in die Kerze getan; die Filtration wurde stets von innen nach außen durchgeführt. Unmittelbar, bevor die durch Papier filtrierte Suspension in die Kerze gebracht wurde, wurde je 1 — in 10 ccm Leitungswasser aufgeschwemmte — Öse von zwei der zur Kontrolle gebrauchten Kulturen hinzugegeben (es wurden gebraucht: *B. prodigiosus*; *B. cholerae gallinarum*, *staphylococcus* und ein äußerst kleiner, ca. 1,2 μ langer *Vibrio*, welchen ich aus Wasser gewonnen habe). Die ganze Filtration wurde bei negativem Druck von 360—420 mm Hg und bei 18—20° ausgeführt und dauerte 40 Min. bis $1^1/_2$ Stunde.

Das auf solche Weise erhaltene Filtrat stellte stets eine vollkommen klare, leicht gelblich gefärbte Flüssigkeit vor. Zu den Versuchen wurden die ersten 50—60 ccm Filtrat benutzt. Kontrollaussaat wurde auf Bouillon, *Hebler*schen Hirnbrei, Agar und Kartoffel gemacht und 7—8 Tage, zum Teil bei Zimmer-, zum Teil bei Brutschranktemperatur aufbewahrt.

Die Meerschweinchen erhielten je 10—12 ccm Filtrat und blieben 23 bis 30 Tage unter genauer Beobachtung, wobei bei ihnen täglich Temperaturmessungen nach der bei uns gewöhnlich angewandten Methode [*Hach*[2])] gemacht wurden.

Zwecks pathologisch-histologischer Untersuchung wurden die in 10proz. Formalinalkohol fixierten Organe benutzt; die Stückchen wurden in Paraffin eingebettet und die Schnitte — gewöhnlich 8 μ dick — mit *Weigert*schem Eisenhämatoxylin-Eosin gefärbt.

Insgesamt habe ich bis zur Zeit 6 Versuchsreihen mit 33 Meerschweinchen unternommen, wobei 17 Versuchstiere mit Filtraten aus den Organen von 7 fleckfieberkranken Meerschweinchen infiziert und 16 Meerschweinchen für Passagen (Versuchsreihen 2, 5 und 6) benutzt wurden. Von den mit Filtrat geimpften Meerschweinchen gingen 3 zugrunde, bevor noch das Ergebnis der Infektion festgestellt werden konnte — die übrigen wie auch die Passagetiere konnten einer genauen Beobachtung unterzogen werden.

Schon in den Organen der Meerschweinchen Nr. 468 und 469 (Versuchsreihe 1), welche je 10 ccm Filtrat erhalten hatten und 19 bis 20 Tage nach der Injektion getötet wurden, konnte ich ohne besondere Mühe, wenn auch schwach ausgesprochene, aber für Fleckfieber typische pathologisch-histologische Veränderungen feststellen, und zwar „Fleckfieberknötchen" und herdweise Schädigungen der größeren Gefäße. In dieser Hinsicht entsprechen meine, die erwähnten Versuchstiere charakterisierenden Befunde denjenigen von *Olitsky*, welcher bei der Mehrzahl der mit Filtrat von Fleckfiebergehirn und Milz infizierten Meerschweinchen ähnliche Veränderungen feststellen konnte*). Doch bei der Analyse der Temperaturkurven, welche die Meerschweinchen der Reihe 1 charakterisierten, bemerkte ich, daß neben obenbezeichneten morphologischen Veränderungen alle diese Tiere auch periodische Temperatursteigerungen

*) Auch *Otto* und *Dietrich* fanden nach der Infektion mit filtrierter Nebennierenaufschwemmung eines fleckfieberkranken Meerschweinchens vereinzelte Herde im Gehirn des infizierten Tieres. Die Filtration geschah durch *Reichel*-Filter.

aufwiesen, welche bei 2 Meerschweinchen (Nr. 468 und 469) die Anzeichen eines cyclischen Verlaufs trugen und zum erstenmal nach einem 10 Tage langen temperaturfreien Intervall eintraten (Abb. 1).

Gewiß, eine solche Kurve entspricht ja absolut nicht dem Begriff einer allgemein anerkannten, für fleckfieberkranke Meerschweinchen typischen Fieberkurve, doch nähert sie sich durch ihre Konfiguration den Kurven, welche ich früher öfters Gelegenheit hatte bei einigen abgeschwächten Fleckfieberinfektionen bei Meerschweinchen zu beobachten [*Hach* [1—4]]. Kurven ähnlicher Konfiguration, mit einer bestimmten Dauer der Inkubationsperiode und des Fieberanfalls sind, meines Erachtens, für das Eintreten der Fleckfiebererkrankung nicht minder beweiskräftig, als eine typische Temperaturkurve, wenn auch die Temperatursteigerungen in solchen Fällen sich gewöhnlich kaum in Zehntelgraden ausdrücken [*Hach*[2]), vgl. *Otto* und *Munter*].

Im gegebenen Falle befestigte die bezeichnete Kurve neben den typischen pathologisch-histologischen Veränderungen mich noch mehr in der ursprünglichen Vermutung, daß bei den mit Filtrat infizierten Tieren vielleicht eine abgeschwächte Fleckfiebererkrankung statthaben könnte. Das tatsächliche Bestehen einer solchen Erkrankung kann auf verschiedene Weise festgestellt werden, doch müssen wir gestehen, daß in gegebenem Falle eine Passageimpfung auf gesunde Tiere die sicherste Beweisführung ist. Von Meerschweinchen Nr. 468 und 469 hatte ich solche Passagen nicht unternommen, und infolgedessen habe ich noch weitere 5 Versuchsreihen aufgestellt, wobei in 3 Versuchsreihen noch weitere 2—5 Passagen gemacht wurden.

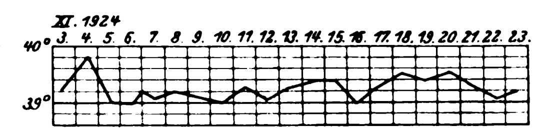


Abb. 1. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 468 (*FI*₁). Ein äußerst schwach ausgesprochener, aber cyclischer Fieberanfall.

Für die Überimpfungen schien es mir geboten, nicht wie *Olitsky* u. a. Blut zu benutzen, sondern das Gehirn oder die Milz, welche entweder auf dem Höhepunkt eines — wenn auch leichteren — Fieberanfalls oder die ersten 2 Tage nach Fieberabfall oder endlich, wenn ein deutlicher Fieberanfall fehlte, nicht vor dem 12.—15. Tage nach der Filtratimpfung (vgl. z. B. *Weil* und *Breinl*) entnommen waren. Insgesamt wurden für die Passagen 16 Meerschweinchen benutzt, welche 0,2 g Gehirn oder zirka ebensoviel Milz intraperitoneal bekamen.

Bei sämtlichen Meerschweinchen, welche Reihe 2—6 angehörten und unmittelbar mit Filtraten infiziert waren, konnten immer ähnliche Symptome beobachtet werden, wie sie auch für Meerschweinchen Nr. 468 und 469 kennzeichnend waren, wobei die Temperaturen bei den meisten etwas stärker als bei Nr. 468 ausgeprägt war, und bloß bei Meerschweinchen Nr. 499 (2. Reihe) fanden vereinzelte irriguläre Temperatursteigerungen — ohne deutlichen Fieberanfall — statt. — Bei sämtlichen Passagemeerschweinchen konnte ein, wenn auch in der Regel schwacher, aber zweifellos cyclischer Fieberanfall von ca. 5 bis

9 Tagen Dauer beobachtet werden, wobei die Temperatursteigerungen gewöhnlich nur einige Zehntelgrade betrugen (Abb. 2, 3, 4 und 5). Die Inkubationsdauer war in diesen Fällen 4—10 Tage lang.

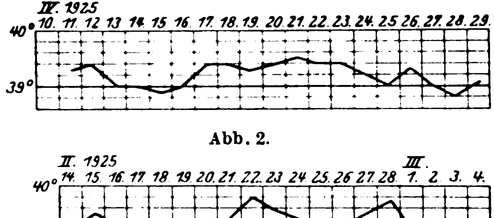


Abb. 2.

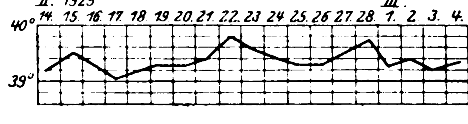


Abb. 3.

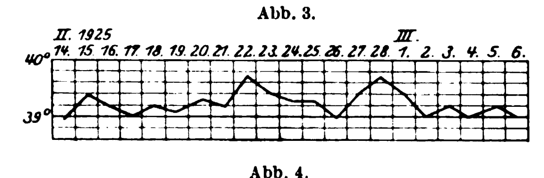


Abb. 4.

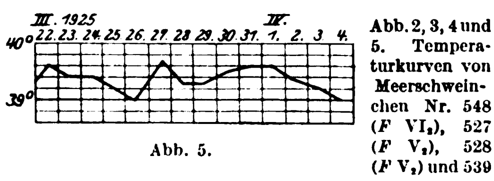


Abb. 5.

Abb. 2, 3, 4 und 5. Temperaturkurven von Meerschweinchen Nr. 548 ($F\ VI_1$), 527 ($F\ V_2$), 528 ($F\ V_1$) und 539 ($F\ V_4$). Schwach ausgesprochene, cyclische Fieberanfälle.

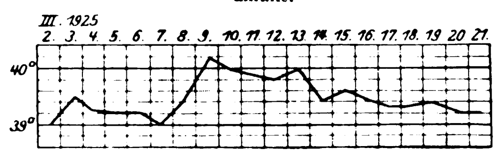


Abb. 6. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 531 ($F\ V_3$). Ein mittelstarker Fieberanfall. Siehe Text.

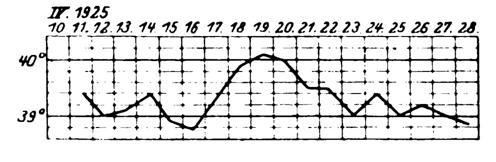


Abb. 7. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 547 ($F\ VI_2$). Ein mittelstarker Fieberanfall.

Neben solchen schwach ausgesprochenen Kurven konnte ich bei 2 Meerschweinchen Nr. 531 — $F\ V_3$ (Abb. 6) und Nr. 547 — $F\ VI_2$ (Abb. 7) eine Temperaturkurve beobachten, welche für einen mittelstarken Fieberanfall sprach.

Bei detaillierter Untersuchung der Organe (Gehirn, Herz, Leber, Niere, Nebenniere) sämtlicher 8 von mir bis heute genau untersuchten Passagetiere (Nr. 522, 527, 528, 531, 539, 542a, 547 und 548), welche am 7. Tage des Fieberanfalls oder am 2. bis 9. Tage nach dem Fieberanfall getötet wurden, konnte ich stets typische pathologisch-histologische Veränderungen (Fleckfieberknötchen, herdweise Schädigungen größerer Gefäße) in Leber, Nieren und Herz feststellen, wobei, was deren Charakter und Intensität betrifft, bei allen Tieren beinahe das gleiche Bild beobachtet wurde. Diese Veränderungen sind bestimmt seltener und weniger ausgesprochen als bei der typischen Fleckfieberinfektion der Meerschweinchen, was besonders in der relativ schwachen Entwicklung der „Fleckfieberknötchen" (Abb. 8) Ausdruck findet. Am stärksten waren Leber (Abb. 9) und Niere (Abb. 10) betroffen*).

*) Meerschweinchen Nr. 527, 539 u. 547 (Abb. 8, 9 u. 10) wurden zwecks Erzielung einer abgeschlossenen Temperaturkurve bis zum Ende der Fieber-

Es ist interessant, zu bemerken, daß ich bei diesen Meerschweinchen kein einziges Mal typische Herdschädigungen der größeren Gefäße und „Fleckfieberknötchen" in irgendwelchem Teil des Zentralnervensystems beobachten konnte; nur bei einem Teil der Tiere konnten banale lymphoide Scheiden um die kleinen Gehirnvenen beobachtet werden. Bei meinen früheren Untersuchungen charakterisierte eine solche Besonderheit der Verteilung der morphologischen Veränderungen auf einzelnen Organen und Systemen stets eine abgeschwächte Infektion bei fleckfieberkranken Meerschweinchen [vgl. *Hach*[3]) [4])].



Abb. 8. Ein deutlich ausgesprochenes „Fleckfieberknötchen" im Myokard des Meerschweinchens Nr. 527 (F V_2). Siehe Abb. 3.

Die drei bekannten Tatsachen: 1. die, wenn auch schwach ausgesprochene, doch in ihrer Konfiguration ganz kennzeichnende Temperaturkurve, 2. die typischen pathologisch-histologischen Veränderungen in den Organen, sowohl der mit Filtraten infizierten als auch der Passagemeerschweinchen, und 3. die erfolgreichen Passagen — *alle diese Tatsachen lassen uns bei den mit Filtraten infizierten Tieren mit genügender Bestimmtheit eine Fleckfiebererkrankung annehmen.* Doch wurden zwecks weiterer Beweisführung 2 Kaninchen (Nr. 15s und 16s) mit dem Gehirn von 2 Passagemeerschweinchen verschiedener Versuchsreihen (Meerschweinchen Nr. 539 — F V_4 — und Nr. 547 — F VI_2 — s. Abb. 5 und 7) infiziert. — Als Folge dieser Impfungen bekam das Serum der beiden Tiere nach 14—18 Tagen die Fähigkeit, den

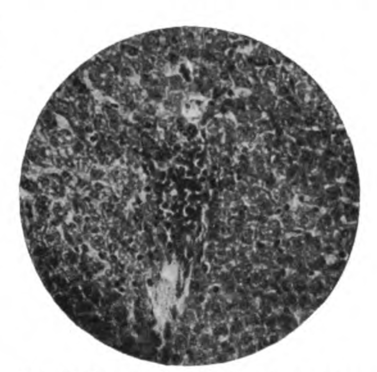


Abb. 9. Ein „Fleckfieberknötchen" in der Leber der Meerschweinchen Nr. 547 (F VI_2). Siehe Abb. 7.

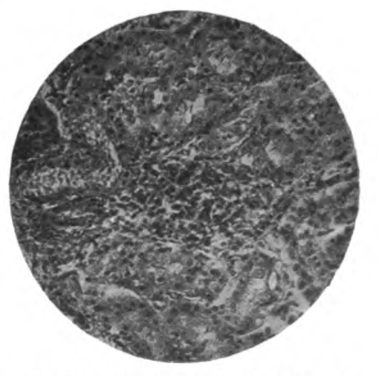


Abb. 10. Ein „Fleckfieberknötchen" in der Nierenrinde des Meerschweinchens Nr. 539 (F V_4). Siehe Abb. 5.

periode lebend erhalten und erst 2—5 Tage nach Fieberabfall getötet; daher muß die unbedeutende Intensität der pathologisch-histologischen Veränderungen in deren Organen zweifellos auch der Rückbildung dieser Veränderungen zugeschrieben werden, welche in der Regel gegen Mitte der ersten Woche nach Ablauf des Fiebers eintritt [*Hach*[3])].

B. proteus Ox 19 — Original-*Weils*-Stamm — in Verdünnung 1 : 40—60 zu agglutinieren. Vor der Impfung war die Agglutination vollkommen negativ, sogar bei Verdünnung 1 : 5—10.

Neben den obenangeführten Tatsachen beweist dieses mit Bestimmtheit, daß bei Passagemeerschweinchen, welche mit den Organen von mit Filtraten infizierten Versuchstieren geimpft waren, streitlos experimentelles Fleckfieber hervorgerufen war [vgl. *Weil* und *Felix*, *Doerr* und *Pick*[2]) u. a.].

Eine besondere Eigentümlichkeit der Infektion sowohl bei den mit Filtraten infizierten als auch bei den Passagetieren stellt das beinahe vollkommene Fehlen typischer Fieberanfälle vor. Nur bei einem geringen Teile der Tiere wurde ein mittelstarker Anfall nachgewiesen, wobei der letztere höchstwahrscheinlich einer eigentümlichen individuellen Konstitution der entsprechenden Tiere zuzuschreiben ist [vgl. *Hach*[1—4])].

Bei meinen Versuchen gab die Passage von Meerschweinchen Nr. 531, welches einen mittelstarken Fieberanfall durchgemacht hatte (Abb. 6), bei den Impftieren einen schwach ausgeprägten, doch cyclischen Anfall, welcher später auch in der nachfolgenden Generation nachgewiesen werden konnte (Abb. 5). — Vom Meerschweinchen Nr. 547 (6. Versuchsreihe), welches eine deutlich ausgeprägte, mittelstarke Temperaturkurve aufwies (Abb. 7), wurde Passage nur in einer Generation gewonnen, doch beide hierzu gehörenden Meerschweinchen (Nr. 556 und 557) zeigten bloß einen schwachen Anfall, ähnlich wie bei Meerschweinchen Nr. 548 (Abb. 2), welches, wie auch Meerschweinchen Nr. 547 zur vorhergehenden (2.) Generation der 6. Versuchsreihe gehörte und gleichzeitig mit diesem infiziert worden war.

Die Ursache dieser Erscheinungen, welche bei den angeführten Versuchen nicht genügend geklärt werden konnten, bedarf einer besonderen Untersuchung*), doch kann man auf Grund der von mir angeführten Beweise — abgesehen von der Temperaturkurve — die erfolgreichen Passagen (wobei der bakteriologische Leichenbefund ganz negativ war) der typischen pathologisch-histologischen Veränderungen in den Organen sämtlicher untersuchten Versuchstiere, — als auch der *Weil-Felix*schen Reaktion bei den Kaninchen, welche mit dem Gehirn von zweien zu zwei verschiedenen Versuchsreihen angehörenden Passagemeerschweinchen infiziert waren — schon jetzt mit Bestimmtheit behaupten, daß *die Filtrate, welche ich aus den virulenten Organen von Fleckfiebermeerschweinchen gewonnen habe, lebendiges Fleckfiebervirus enthielten, welches befähigt war, bei Meerschweinchen eine zwar abgeschwächte, doch unzweideutige Erkrankung auszulösen*, und folglich, *daß das lebende Fleckfiebervirus fähig ist, durch die Chamberland-*„F“-*Kerze zu passieren.*

*) Zur Zeit gelten meine Versuche dem Studium der Bedingungen, unter denen es möglich ist, mit Filtraten von Organen fleckfieberkranker Meerschweinchen typische, nicht nur abgeschwächte Erkrankung hervorzurufen.

Die von mir angewandte Methodik unterscheidet sich von denen anderer Autoren dadurch, daß ich während meiner Versuche besondere Aufmerksamkeit einer allseitigen Untersuchung der mit Filtraten infizierten Meerschweinchen zuwandte, wobei stets die Möglichkeit einer atypischen „inapparenten“ Erkrankung im Auge behalten wurde.

Wie bekannt, ist die Fähigkeit, ein Bakterienfilter zu passieren, an und für sich noch nicht genügend, um einen bestimmten Mikroorganismus mit Sicherheit in die eine oder in die andere biologische Gruppe einzureihen (vgl. *Roux*, *Remlinger*, *Lipschütz*, *Rosenthal*, *McNeal* und *Novy*, *Schaudinn*, *Noguchi* u. a.). Dementsprechend gibt uns die Tatsache der Filtrierbarkeit des in den Organen des Fleckfiebermeerschweinchens enthaltenen Fleckfiebervirus noch nicht die Berechtigung, daraus endgültige Schlüsse über seine Biologie zu ziehen, wenn auch sie in gewissem Sinne die Biologie dieses Virus — speziell die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Mikrobenzelle u. dgl. m. — kennzeichnet. Doch will es mir scheinen, daß diese Tatsache, abgesehen, daß sie ein selbständiges Interesse vorstellt, auch bei der Auswahl der Methodik bei gewissen Versuchen, welche die weitere Erforschung des Fleckfiebervirus erstreben, mit Erfolg benutzt werden kann.

Die vorliegenden Versuche waren schon vollkommen abgeschlossen und dem IX. Allrussischen Kongreß für Bakteriologie mitgeteilt, als das laufende Heft (April 1925) der „Archives de l'Institut Pasteur de Tunis“ in Moskau erhalten und mir dank der ausschließlichen Liebenswürdigkeit von Prof. *L. A. Tarassévitch* und Prof. *D. K. Zabolotny* überlassen wurde. In diesem Heft waren die Arbeiten von *Nicolle* und *Lebailly* als auch von *Nicolle* und *Blanc* über die Filtrierbarkeit des Fleckfiebervirus veröffentlicht. — *Nicolle* und *Lebailly* führten die Filtration einer Aufschwemmung von virulenter Nebenniere von Fleckfiebermeerschweinchen durch die *Chamberland*-„L2“-Kerze aus und konnten in 2 von 5 Fällen*) bei den mit Filtraten infizierten Meerschweinchen zweifellose Erkrankungserscheinungen feststellen. Die Autoren bemerken nachdrücklich, daß sie die überzeugenden Beweise der Filtrierbarkeit des Fleckfiebervirus nur dadurch erhalten haben, daß sie ihre besondere Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit einer „inapparenten“ Infektion bei den mit Filtraten infizierten Meerschweinchen lenkten**).

Indem *Nicolle* und *Lebailly* von den 2 Versuchen ausgehen, bei denen sie das Fleckfiebervirus im Filtrat nicht konstatieren konnten, meinen sie, daß das-

*) 2 — negativ und 1 — zweifelhafter, was von einem Defekt der Methodik abhängig war.

**) In seinem gleichzeitig erschienenen Artikel rechnet *Nicolle* zu diesen „inapparenten“ Erkrankungen alle diejenigen, wo die Temperaturkurve atypisch verläuft. Einige von *Nicolle* angeführten Kurven entsprechen vollkommen den von mir vorher veröffentlichten [vgl. *Hach* [2—4]] als auch den hier angegebenen.

selbe nicht immer in das Filtrat übergeht. Ich meine aber, daß wir in solchen Fällen nur mit den Versuchen rechnen müssen, wo bei tadelloser Methodik und genügender Versuchsanzahl das Virus seine Fähigkeit — durch die Kerze durchzudringen — bewiesen hat, da diese Tatsache uns vollkommen berechtigt, das Virus — unter diesen bestimmten Bedingungen — als ein filtrierbares anzusehen (vgl. z. B. die Versuche von *Negri*, *Carini*, *Casagrandi* u. a. bei Filtration von Variola-Vaccinevirus).

Wenn wir von einem Fall absehen, wo *Nicolle* und *Lebailly* bei den mit Filtrat infizierten Meerschweinchen einen typischen Fieberanfall beobachtet haben, und der, meiner Ansicht nach, am ehesten durch die verschiedene Durchgängigkeit der Filter (die Kerze „F" in meinen Versuchen und diejenige „L 2" in Versuchen von *Nicolle* und *Lebailly*) erklärt werden kann und auch von den Autoren, wie oben erwähnt, nicht als maßgebend betrachtet wird, so sind die Befunde der genannten Autoren vollkommen identisch mit den meinigen, so in Hinsicht des tatsächlichen Materiales als auch im Sinne unserer Schlußfolgerungen.

Zusammenfassung.

1. Indem ich die durch die *Chamberland*-„F"-Kerze gewonnenen Filtrate einer Aufschwemmung aus den Organen von 7 fleckfieberkranken, am 3. bis 6. Tag des Fieberanfalls getöteten Meerschweinchen injizierte, konnte ich bei 14 gesunden Meerschweinchen ein unzweideutiges, experimentelles Fleckfieber auslösen, was durch einen, zwar leichten, aber deutlich ausgesprochenen, cyclischen Fieberanfall, durch typische pathologisch-histologische Veränderungen in den Organen und nachfolgende erfolgreiche Passagen nachgewiesen wurde.

2. In den Versuchsreihen 2, 5 und 6 wurde das Fleckfiebervirus durch weitere Passagen in 2—5 Generationen fortgeführt. Bei sämtlichen 16 Passagemeerschweinchen konnte eine zweifellose Erkrankung beobachtet werden, welche sich in einem cyclischen Fieberanfall äußerte und mit typischen pathologisch-histologischen Veränderungen in den Organen einherging und auch durch die *Weil-Felix*sche Reaktion bei den Kaninchen nachgewiesen werden konnte, welche mit dem Gehirn zweier, zu zwei verschiedenen Versuchsreihen (5 und 6) gehörenden Passagemeerschweinchen infiziert waren.

3. Nur bei 2 Passagemeerschweinchen (Nr. 531 und 547) wurde ein mittelstarker Fieberanfall beobachtet, bei den übrigen 14 Tieren waren die Temperatursteigerungen — ungeachtet des unzweideutig cyclischen Fieberanfalls von typischer Dauer — nur in einigen Zehntelgraden ausgedrückt.

4. Das Bestehen einer, wenn auch abgeschwächten, doch zweifellos nachgewiesenen Erkrankung bei sämtlichen mit Filtrat infizierten Meerschweinchen berechtigt zu der Anahme, daß in den von mir gewonnenen Filtraten lebendes Fleckfiebervirus enthalten war.

5. Die für diese Schlußfolgerung am meisten maßgebenden Befunde konnte ich dadurch erzielen, daß ich bei den vorliegenden Versuchen meine Aufmerksamkeit besonders auf die Möglichkeit einer atypischen Form von experimentellem Fleckfieber bei den mit Filtraten infizierten Meerschweinchen lenkte. Ende August 1925.

Literaturverzeichnis.

Abe, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **91**. 1924. — *Barykin, Kompanejetz, Sacharoff, Barykina* und *Pysin*, Verhandl. der IX. Allruss. Kongress. f. Bakteriol. zu Moskau, 1925. — *Barykin* und *Kritsch*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **27**. 1923. — *Carini*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **42**. 1906. — *Casagrandi*, zit. nach *Tomarkin* und *Carrière*, Handb. der pathol. Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, 2. Aufl., Bd. VIII. 1913. — *Cowdry*, 1. Journ. of exp. med. **37**. 1923; 2. Bull. Pasteur **23**, 528. 1925. — *Doerr*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **85**. 1920; Beih. Bericht über die 8. Tag. des Fr.-Verein. f. Mikrob. — *Doerr* und *Pick*, 1. Wien. klin. Wochenschr. 1918, Nr. 30; 2. Zeitschr. f. Hyg. **89**. 1920. — *Fejgin*, Compt. rend. de la soc. de biol. **90**. 1924 und **93**. 1925. — *Goldberger* und *Anderson*, Public health reports **27**. 1912; zit. nach *Rocha-Lima*. — *Hach*, 1. Verhandl. des IV. Allukrain. Bakteriologentag. 1924 2. Zeitschr. f. Hyg. **104**, 319. 1925; 3. Virchows Archiv **256**, 495. 1925; 4. Zeitschr. f. Hyg. **104**, 337. 1925. — *Hartmann* und *Schilling*, Die pathogenen Protozoen. Berlin 1917. — *Hegler* und *Prowazek*, Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 44. — *Krontowski* und *Hach*, 1. Vortr. in der Med. Sekt. der Allukrain. Akad. der Wissensch., 8. VII. 1921. 2. Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 5. 3. Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 36. 4. Arch. f. exp. Zellforsch. im Druck. — *Kuczynski*, 1. Virchows Archiv **242**. 1923; 2. Krankheitsforschung **1**, H. 1. 1925. — *Kutejstschikow*, Hygiena i Epidemiologija 1925, Nr. 2 (russ.). — *Landsteiner* und *Hausmann*, Med! Klinik 1918, Nr. 21. — *Lipschütz*, Handb. d. pathol. Mikroorg. von Kolle und Wassermann, 2. Aufl., Bd. VIII. 1913. — *McNeal* und *Novy*, zit. nach *Rosenthal*. — *Negri*, Zeitschr. f. Hyg. **54**. 1906. — *Nicolle*, Arch. de l'Inst. Past. de Tunis **14**. 1925. — *Nicolle* und *Blanc*, Ibid. — *Nicolle, Blanc* und *Conseil*, Arch. de l'Inst. de Past. Tunis **9**. 1914; zit. nach *Rocha-Lima*. — *Nicolle, Conor* und *Conseil*, Ann. de l'inst. Pasteur **25**. 1911. — *Nicolle* und *Lebailly*, Arch. de l'Inst. Past. de Tunis **14**. 1925. — *Noguchi*, 1. Journ. of exp. med. **15**. 1912; 2. Stud. of Rockefell. Inst. **34** u. **35**. 1920; **36** u. **38**. 1921. — *Olitsky*, 1. Journ. of exp. med. **35**, 115. 1922; 2. Ibid. S. 121; 3. Ibid. S. 469. — *Otto* und *Dietrich*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **82**. 1919. — *Otto* und *Munter*, Zeitschr. f. Hyg. **104**. 1925. — *Prowazek*, Beitr. z. Klin. d. Infektionskrankh. u. z. Immunitätsforsch. **4**. 1914. — *Prowazek* und *Rocha-Lima*, zit. nach *Rocha-Lima*. — *Remlinger*, Bull. Pasteur 1906. — *Ricketts* und *Wilder*, Journ. of the Americ. med. assoc. 1910; zit. nach *Rocha-Lima*. — *Rocha-Lima*, Ergebn. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **19**, H. 1. 1919. — *Rosenthal*, *W.*, Handb. der mikrobiol. Technik von Kraus und Uhlenhut Bd. **3**. 1924. — *Roux*, Bull. Pasteur 1903. — *Schaudinn*, Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte **20**. 1904. — *Schnabel*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref., **75**. 1923; Sitzungsber. d. Berl. Ges. f. Mikrobiol., 13. VI. 1923. — *Weigl*, Zeitschr. f. Hyg. **99**. 1923. — *Weil* und *Breinl*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **37**. 1923. — *Weil* und *Felix*, zit. nach *Doerr*. — *Wolbach, Todd* und *Palfry*, The Etiology a. Pathology of Typhus. Cambridge Mass. 1922. — *Woodcock*, Journ. of the roy. army med. corps **40**. 1923 und **42**. 1924; Ref. Abstr. of Bakteriol. **8**, Nr. 6 u. 7. 1924.

(Aus dem Bakteriologischen Institut zu Kiew.)

Zur Frage des experimentellen Scharlachs *).

Vorläufige Mitteilung.

Von

Priv.-Doz. Dr. **I. W. Hach** und Dr. **N. P. Bordzilowskaja.**

Vorstand der Variola-Vaccineabteilung des Instituts.

Mit 13 Textabbildungen.

Das Problem der Ätiologie und Pathogenese des Scharlachs kann zur Zeit, unserer Meinung nach, noch nicht als vollständig geklärt aufgefaßt werden, auch was die Grundfragen betrifft.

G. F. und *G. H. Dick* und andere amerikanische Autoren vertreten den Standpunkt, daß eine besondere Streptokokkenart eine ausschließliche Bedeutung als Scharlacherreger hat; dieser Standpunkt steht in direktem Widerspruch mit den Befunden von *di Cristina, Caronia, Sindoni* und anderer italienischer Autoren, welche aus Scharlachmaterial eine spezielle Mikrobenart gewonnen haben, die mit Streptokokken nichts gemein hat und von diesen Autoren in direkten ätiologischen Zusammenhang mit dem Scharlach gebracht wird. Doch konnten zu gleicher Zeit andere ernste Forscher weder die Befunde von *di Cristina, Caronia* u. a. m. (*Bürgers* und *Bachmann* u. a.) noch die Schlußfolgerungen der Amerikaner bekräftigen (*Korschun* u. a.) **).

Es will uns scheinen, daß bei dieser Sachlage nur die experimentelle Methode diese Fragen bedeutend aufklären könnte.

Nun haben die Arbeiten von *Grünbaum, Cantacouzène, Landsteiner, Levaditi* und *Prasek, Bernhardt, Caronia* u. a. gezeigt, daß bei höheren und niedrigeren Affenarten, Kaninchen und Ferkeln als Resultat der Einimpfung von Scharlachmaterial eine Erkrankung auftritt, welche in einigen Beziehungen dem Scharlach beim Menschen nahesteht, doch haben wir, soweit uns bekannt, bisher keinen experimentellen Scharlach, der als zuverlässige Methode zur Erforschung dieser Erkrankung dienen könnte. Bisher haben wir auch keine genügenden Erfahrungen, um die Frage zu lösen, welches Tier sich am besten als Versuchsobjekt gegenüber dem Scharlachvirus eignet. und — was die Hauptsache — wir haben äußerst wenig Kenntnis von dem Symptomenminimum, welches die erfolgreiche Infektion

---

*) Mitgeteilt bei der Diskussion auf dem IX. Allrussischen Kongreß für Bakteriologie, Epidemiologie und Sanitätswesen, den 25. V. bis 1. VI. 1925 in Moskau.

) Auch die letzten Arbeiten von *Friedemann* und *Deicher* (Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 46—47), sowie von *W. H. Park* (Journ. of the Americ. med. assoc. **85, Nr. 16. 1925) einerseits, und diejenige von *Kleinschmidt* (Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 49) anderseits, geben widersprechende Angaben über die Bedeutung der Streptokokken in der Ätiologie des Scharlachs. (Anm. bei Korrektur.)

kennzeichnet. Wenn wir annehmen, daß die genannten Autoren bei ihren Beobachtungen die deutlichsten Erkrankungssymptome bei Affen feststellen, so müßte — in Anbetracht dessen, daß diese Tiere für die Mehrzahl unserer Laboratorien unerreichbar sind — auch die Frage studiert werden, ob es möglich ist, Affen durch andere — in dieser Hinsicht bequemere — Versuchstiere zu ersetzen.

Infolgedessen schien es uns interessant, zu versuchen, bestimmte Ergebnisse betreffs der Möglichkeit einer experimentellen Scharlachinfektion beim Meerschweinchen zu gewinnen.

Soweit uns bekannt, wurden bisher keinerlei einschlägige Versuche gemacht, um diese Tiere mittels Verimpfung von Material scharlachkranker Menschen zu infizieren. Nur die italienischen Autoren verimpften ihre Kulturen an Meerschweinchen; sie konnten bei den letzteren Kachexie und tödlichen Ausgang beobachten. In der Arbeit von *Doerr* und *Pick*, welche die Frage des experimentellen Fleckfiebers behandelt, finden wir den Hinweis, daß bei einem Kontrollmeerschweinchen, welches mit dem Blute von Scharlachkranken infiziert war, undeutliche Temperatursteigerungen beobachtet werden konnten.

Auch *Otto* und *Dietrich* erwähnen, daß sie nach der Injektion von Scharlachkranken-Blut nach einer Inkubationszeit von mehreren Tagen Temperatursteigerungen beobachtet haben, die mehrere Tage lang in gewisser Höhe anhielten.

Bei unseren Versuchen nahmen wir uns vor, zur Infektion von Meerschweinchen in erster Linie das Blut von Scharlachkranken zu gebrauchen, welches in demjenigen Krankheitsstadium entnommen wird, wo einerseits das Scharlachvirus zweifellos im Blute zirkuliert und andererseits das Blut am meisten frei von banalen, sekundär in den Organismus eingedrungenen Bakterien ist. Als solcher Zeitpunkt kann unseres Erachtens der 2. bis 3. Fiebertag, wo der Hautausschlag auftritt, gelten (vgl. z. B. *Jochmann*).

Zur Injektion der Meerschweinchen wurden mittelschwere, ohne klinische Komplikationen verlaufende Scharlachfälle gewählt, wobei dem Kranken 10 bis 12 ccm Blut am 2.—3. Erkrankungstage, wo die klinischen Symptome die Richtigkeit der Diagnose bekräftigten, entnommen wurde. Das mittels Spritze aus der Vene genommene Blut wurde je 3—5 ccm — unmittelbar am Krankenlager — 2—4 (300—400 g schweren) Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Nach der Injektion verblieben die Tiere mindestens 30 Tage in strenger Beobachtung, wobei die Temperatur täglich, nach der bei uns üblichen Methode [vgl. *Hach*[1])] in recto gemessen wurde. Zwecks pathologisch-histologischer Untersuchung wurden die Organe der zu verschiedenen Zeitperioden nach der Infektion getöteten Tiere in 10proz. Formalin-Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet, die Schnitte zwecks üblicher Untersuchung mit *Weigert*schem Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Insgesamt haben wir bisher zu unseren Versuchen 67 Meerschweinchen benutzt, wobei wir das Blut von 4 Scharlachkranken (aus der Infektionsabteilung des Oktober-Krankenhauses zu Kiew), welche späterhin eine mittelstarke Scharlacherkrankung durchmachten, 11 Tieren injizierten, von denen jedes nicht unter 3 ccm Blut intraperitoneal erhielt. Als Resultat der Impfung konnten wir bei einem Teil der Meerschweinchen (Nr. 1s, 4s, 41s, 43s und 44s, die mit Blut von Kranken M., B. und K. geimpft waren) eine Erkrankung beobachten, welche

in erster Reihe in einem — nach einem 7—16 Tage langen, fieberfreien Zeitraum eintretenden — Fieberanfall ihren Ausdruck fand. Am deutlichsten trat er bei Meerschweinchen Nr. 41s (Abb. 1) und Nr. 44s (Abb. 2) auf.

Von einigen dieser fiebernden Meerschweinchen entnahmen wir Herzblut, welches teils zur Aussaat auf verschiedene bakteriologische Nährböden benutzt, teils gesunden Meerschweinchen — je 3—4 ccm — intraperitoneal injiziert wurde. In allen Fällen blieb die (aerobe und anaerobe) Aussaat steril. Die pathologisch-anatomische und bakteriologische Untersuchung solcher Tiere hatte keinerlei Hinweis auf das Bestehen irgendwelcher banalen

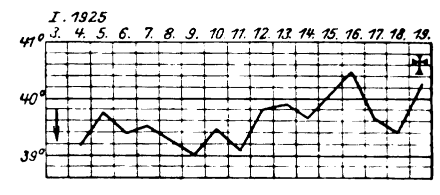


Abb. 1. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 41s (1. Generation der Versuchsreihe K). Deutlicher Fieberanfall nach 9 Tage langer Inkubation.

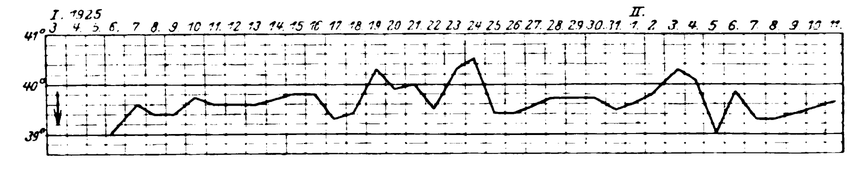


Abb. 2. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 44s (1. Generation der Versuchsreihe B) s. Text.

Bakterieninfektion ergeben. Im weiteren versuchten wir Passage zu gewinnen mittels einer Aufschwemmung aus den Organen (Milz resp. Gehirn) der auf dem Höhepunkt des Fieberanfalls getöteten Tiere.

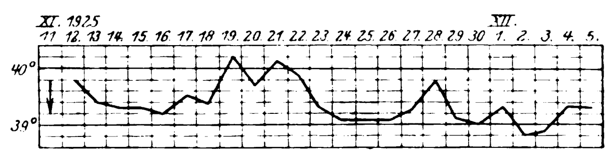


Abb. 3. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 20s (3. Generation der Versuchsreihe M) s. Text.

Insgesamt haben wir bisher zu Passageimpfungen 56 Meerschweinchen benutzt und bei einem bedeutenden Teil der Meerschweinchen in allen — 4 (Reihe B. und K.) bis 11 (Reihe M.) — Generationen einen deutlich cyclischen Fieberanfall beobachtet. Die Temperaturkurve war bei weitem nicht bei allen Versuchstieren gleich ausgeprägt*) (Abb. 3, 4,

*) Von der Gesamtzahl der 67 mit dem Blute von Scharlachkranken infizierten und der Passagemeerschweinchen konnten wir bei 28 eine deutlich ausgeprägte Kurve beobachten und bei 22 eine Temperaturkurve, welche für eine gewisse Störung der Wärmeregulation sprach, wobei die Steigerungen aber unregelmäßiger Natur waren; 13 Versuchstiere ergaben eine Kurve, welche sich in nichts von der normalen unterschied; 4 gingen zugrunde, bevor die Resultate des Versuches festgestellt werden konnten.

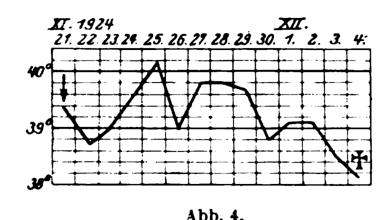


Abb. 4.

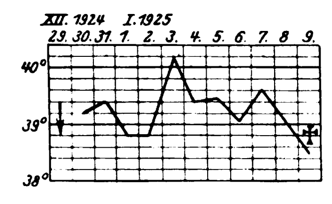


Abb. 5.

Abb. 4 und 5. Temperaturkurven von Meerschweinchen Nr. 26s und 39s (4. und 8. Generationen der Versuchsreihe M). Deutlich ausgesprochener Fieberanfall.

5, 6, 7, 8, 9), doch bei allen 3 Versuchsreihen zeigten die beobachteten Temperaturkurven einige gemeinschaftliche Merkmale.

Der Fieberanfall trat erstens nach einer gewissen Inkubationsperiode, welche bei 28 Meerschweinchen, die eine deutlich ausgeprägte Temperaturkurve aufwiesen, 3—16, und bei 22 von diesen Meerschweinchen 5—9 Tage andauerte. Der Fieberanfall an und für sich hielt ferner bei 24 Meerschweinchen (welche von den obigen bis zum Fieberabfall beim Leben erhalten wurden) 2—9 (bei 21 Tieren 3—7) Tage an.

Die allgemeine Konfiguration der Kurven in dem Teil, welcher auf das Bestehen eines cyclischen Fieberanfalls hinweist, ist insofern charakteristisch, als die Temperatursteigerungen sich in 0,7° bis 1° ausdrückten und nicht den Charakter von F. continua trugen; für gewöhnlich konnten im Laufe eines Fieberanfalls einigemal Senkungszacken beobachtet werden, was der

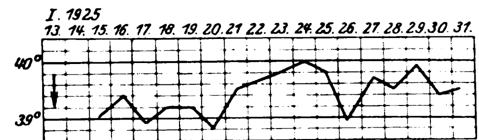


Abb. 6. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 53s (2. Generation der Versuchsreihe B). Deutlich ausgesprochener Fieberanfall. Tier wurde vor Fieberabfall getötet.

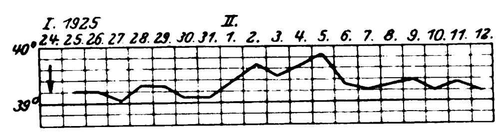


Abb. 7. Temperaturkurve von Meerschweinchen Nr. 55s (10. Generation der Versuchsreihe M). Schwach ausgesprochener, aber deutlich cyclischer, 4tägiger Fieberanfall nach 9 Tage langer Inkubation.

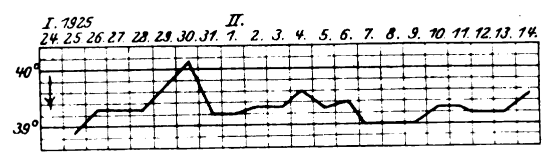


Abb. 8.

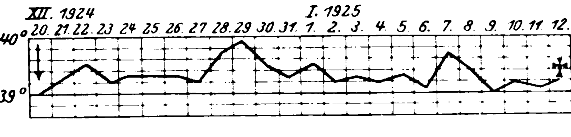


Abb. 9.

Abb. 8 und 9. Temperaturkurven von Meerschweinchen Nr. 57s und 36s (3. Generation der Versuchsreihe B und 7. Generation der Versuchsreihe M). Beispiele einer schwach ausgesprochenen Temperaturkurve (s. Text).

Kurve ein recht charakteristisches Aussehen verlieh (Abb. 2, 3, 4, 5 und 7).

Bei einer genaueren Analyse der Kurven konnten wir feststellen, daß bei 16 Meerschweinchen, welche einen cyclischen Fieberanfall durchgemacht hatten, sich einige Zeit nach Ablauf dieses Anfalls wiederum Temperatursteigerungen zeigten, die verschieden lange anhielten (Abb. 2 und 3) und in einem Teil der Fälle der Periode entsprachen, wo sich die eine oder die andere sekundäre Infektion einstellte (s. unten). Doch in einer Reihe von Fällen (Meerschweinchen Nr. 20 s, 44 s u. a.) konnte eine genaue bakteriologische und pathologisch-anatomische Untersuchung der Organe solcher Tiere keinerlei Veränderung feststellen, durch welche sich diese abermalige Temperatursteigerung genügend erklären ließe. Diese Tatsache kann unseres Erachtens ähnlichen Erscheinungen bei Scharlacherkrankung beim Menschen entgegengestellt werden und entspricht ähnlichen Beobachtungen bei einem Teil der Kaninchen, denen bei den Versuchen von *Zlatogoroff, Derkatsch* und *Nasledyscheva* verschiedenartiges Scharlachmaterial eingeimpft worden war.

Neben dem Fieberanfall konnte man bei Meerschweinchen, welchen unmittelbar das Blut Scharlachkranker verimpft war, wie auch bei Passagetieren während der erhöhten Temperatur *ganz deutliche Veränderungen im Allgemeinbefinden und im Äußeren* beobachten. Die Tiere wurden matt, verloren die Freßlust, das Haar schien zu dieser Zeit immer gesträubt usw. Gegen das Ende des Fieberanfalls verloren die Meerschweinchen bedeutend an Gewicht, und bei einem Teil der Versuche (Meerschweinchen 26s, 39s u. a.) gingen die Tiere unter Erscheinungen von allgemeiner Schwäche und Hypothermie zugrunde (s. Abb. 4 u. 5). Die größte Mehrzahl der in unseren Versuchen benutzten Meerschweinchen blieb am Leben, doch zeigten die Tiere nach dem Fieberanfall im Laufe der nächsten 2—3 Wochen eine deutlich ausgesprochene Empfänglichkeit gegenüber verschiedenartigen sekundären Infektionen als Pneumonien, Darmerkrankungen usw.

Diese Empfindlichkeit trat besonders in den Fällen hervor, wo sich in demselben Käfig neben Meerschweinchen, die diesen Versuchen unterzogen worden waren, auch ehemals fleckfieberkranke Meerschweinchen befanden; bei diesen Verhältnissen erkrankten an ähnlichen Infektionen am öftesten — wenn nicht ausschließlich — die ersteren.

Abgesehen von den bezeichneten Erscheinungen bei den Meerschweinchen, welche unseren sämtlichen 3 Versuchsreihen angehörten, und die auf dem Höhepunkt oder kurz nach Ablauf des Fieberanfalls getötet wurden, konnten wir stets *eine deutliche Vergrößerung der Milz* vorfinden, *welche dabei eine braunrote Färbung annahm.* Auf dem Schnitte waren deutlich vergrößerte Malpighi-Körperchen zu sehen.

Zwecks weiterer Erforschung der Natur dieser Erkrankung untersuchten wir die Nieren von 11 Meerschweinchen, welche bei verschiedenen Stadien des Fieberanfalls als auch früher oder später nach dessen Ablauf getötet worden waren. In den Nieren von solchen Meerschweinchen konnten wir stets Veränderungen in Form einer trüben Auf-

quellung des Nierenepithels und seltener in Form einiger herdförmiger Zellenanhäufungen mit sich intensiv färbendem Kern zwischen den gewundenen Harnkanälchen beobachten.

Nebenbei konnten wir bei einem Teil dieser Meerschweinchen eine gewisse Veränderung der Glomeruli vorfinden, welche in 2 Fällen (Meerschweinchen Nr. 8s und Nr. 11s — beide der Reihe „M" —, die

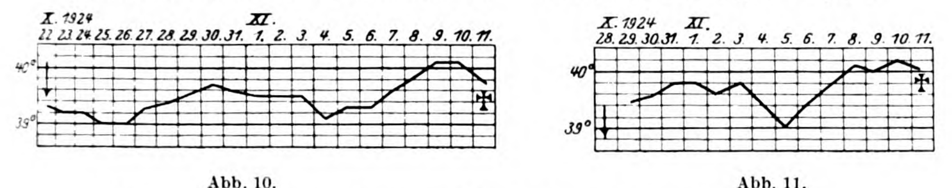


Abb. 10. Abb. 11.

Abb. 10 und 11. Temperaturkurven von Meerschweinchen Nr. 8s und 11s (s. Text).

15—21 Tage nach der Infektion getötet wurden) einer Glomerulitis und Glomerulonephritis beim Menschen äußerst ähnlich war (s. Abb. 10, 11, 12 und 13).

Bei keinem einzigen der sonst von uns beobachteten Tiere konnten wir je solche Veränderungen feststellen, welche — was Intensität

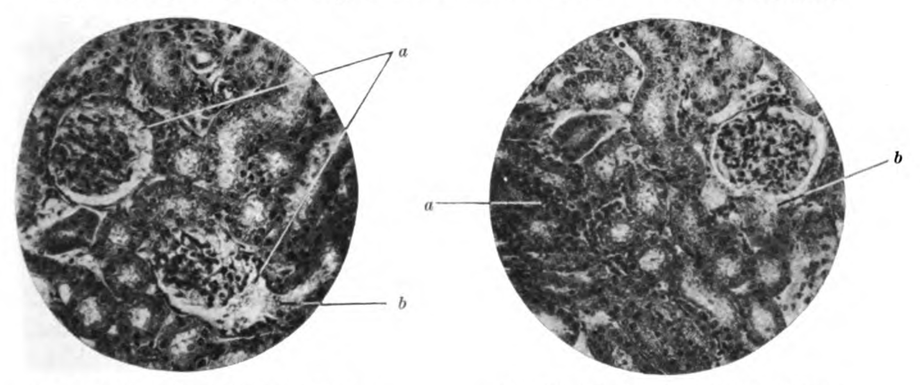


Abb. 12. Schnitt durch Niere von Meerschweinchen Nr. 8s. Bedeutendes Exsudat im Lumen der Baumannschen Kapsel (a), welches den Glomerulus komprimiert. Exsudat (b) in der Anfangsschleife des gewundenen Harnkanälchen. Zeiss. Apochr. 4 mm. Projektionsok. Nr. 4.

Abb. 13. Schnitt durch Niere von Meerschweinchen Nr. 11s. Vergrößerte, kernreiche Glomerulus. Zellige Infiltration (a) zwischen den Harnkanälchen. In der Kapsel und in der Anfangsschleife des gewundenen Harnkanälchens: Exsudat (b). Zeiss. Apochr. 4 mm. Projektionsok. Nr. 4.

betrifft — den obigen gleichgekommen wären; doch die Veränderung einzelner Glomeruli konnten wir zweifellos auch bei anderen Meerschweinchen vorfinden (Nr. 1s, 44s, 53s u. a. m.). Wenn wir von den Veränderungen in der Niere von Meerschweinchen Nr. 8s und 11s absehen, so konnten diejenigen, welche die übrigen angegebenen Meerschweinchen kennzeichneten, weder bei den 8 normalen noch bei den

über 100 fleckfieberkranken Tieren, welche der eine von uns (*Hach*[2]) bei den Fleckfieberversuchen genau untersucht hatte, nachgewiesen werden. Infolgedessen scheint es uns doch, daß diese *Veränderungen* schon jetzt — jedenfalls *mit größter Wahrscheinlichkeit — zu den charakteristischen Merkmalen der Erkrankung, welche wir bei unseren Meerschweinchen ausgelöst hatten, gerechnet werden müssen.*

Wir konnten also im Laufe der vorliegenden Versuche beobachten, daß bei einer recht bedeutenden Anzahl von Meerschweinchen, denen intraperitoneal 3—5 ccm Blut scharlachkranker Menschen eingeimpft war, eine Erkrankung eintrat, welche sich kennzeichnete: 1. durch eine mehr oder minder deutliche Temperaturkurve, 2. durch ein verändertes Aussehen der Tiere während der Dauer des Fieberanfalls, 3. durch das Eingehen einiger infizierten Meerschweinchen und 4. durch charakteristische Veränderung der Milz und (wenigstens bei einem Teil der Versuchstiere) durch Nierenaffektionen, welche den deutlich ausgesprochenen Charakter einer Glomerulitis, evtl. Glomerulonephritis hatten. Diese Erkrankung konnte, durch 4—11 Generationen, auf 56 Meerschweinchen weitergeführt werden, wobei eine bedeutende Anzahl derselben ständig das gleiche Erkrankungsbild aufwies.

Alle diese Tatsachen erlauben uns, wie es uns scheinen will, anzunehmen, daß *unsere Meerschweinchen zweifellos irgendeine Infektionserkrankung durchgemacht haben, welche wir durch die bezeichneten Passagen durchführen konnten.*

In Anbetracht dessen, daß es uns bei der genauesten bakteriologischen Untersuchung der Tiere in keinem einzigen Falle gelingen wollte, irgendwelche Mikroben nachzuweisen, muß man annehmen, daß *diese Infektion nicht durch banale Bakterien verursacht war.*

Auf Grund der oben angeführten Tatsachen darf unseres Erachtens anerkannt werden, daß die bei unseren Meerschweinchen betrachtete Erkrankung entweder in einem Zusammenhang mit dem Scharlach beim Menschen steht oder eine spontane Infektion bei Meerschweinchen vorstellt. Die uns zur Zeit zur Verfügung stehenden Tatsachen sind gewiß nicht genügend, um die Erkrankung unserer Meerschweinchen als experimentellen Scharlach anzusehen, andererseits ist jedoch bisher — jedenfalls soweit uns bekannt — keine ähnliche spontane Erkrankung bei Meerschweinchen beschrieben worden. Speziell während der Fleckfieberforschungen, welche der eine von uns (*Hach*[1,2,3,4]) im Laufe von 5 Jahren andauernd fortgeführt hat, und zu denen bisher über 600 Meerschweinchen benutzt wurden, konnte bei diesen Tieren bisher keine einzige spontane Erkrankung nachgewiesen werden, welche dem Krankheitsbild ähnlich wäre, das wir an unseren Tieren bei diesen vorliegenden Versuchen beobachteten. Infolgedessen können wir annehmen, daß die angeführten Tatsachen ein gewisses Interesse bieten,

und erlauben uns — indem wir unsere Versuche weiterführen —, die einstweilen gewonnenen Resultate unserer bisherigen Untersuchungen mitzuteilen.

Zusammenfassung.

1. Bei intraperitonealer Injektion von 3—5 ccm Blut, das von 3 scharlachkranken Menschen am 2. bis 3. Erkrankungstage gewonnen wurde, auf 11 Meerschweinchen trat bei 5 von ihnen eine Erkrankung auf, welche sich durch einen deutlich ausgesprochenen Fieberanfall, verändertes Aussehen der erkrankten Tiere und Milzvergrößerung kennzeichnete. Die Aussaaten von Blut und Organen der erkrankten Tiere auf gewöhnliche Nährböden blieben immer steril.

2. Wenn wir gesunden Meerschweinchen Blut, Milz resp. Gehirn von den auf dem Höhepunkt des (nach Scharlachblutimpfung eingetretenen) Fieberanfalls befindlichen Meerschweinchen injizierten, konnten wir bei den Tieren eine ebensolche Erkrankung auslösen, welche darauf in 3 Versuchsreihen durch 4—11 Generationen auf 56 Meerschweinchen weitergeführt wurde, wobei die Mehrzahl dieser Tiere das gleiche Krankheitsbild ergaben.

3. Der pathologisch-anatomische Befund der Meerschweinchen, welche auf der Höhe des Fiebers getötet wurden, ergab ebenso wie der von 2 Tieren, welche infolge einer komplikationslosen Infektion 7—11 Tage nach Auftreten des Fiebers zugrunde gingen, als charakteristisches Merkmal eine recht bedeutende Vergrößerung der Milz, die in der Regel eine braunrote Färbung aufwies. Bei der bakteriologischen Untersuchung der Organe und des Blutes von Passagemeerschweinchen konnten wir keinerlei Mikroben nachweisen.

4. Die pathologisch-histologische Nierenuntersuchung von 11 Meerschweinchen, welche zu verschiedenen Zeitperioden nach der Injektion getötet waren, ergab bei einigen Tieren eine trübe Schwellung des Nierenepithels und Anzeichen einer Affektion der Glomeruli, welche bei 2 Meerschweinchen (Nr. 8s und 11s) den Charakter einer deutlich ausgesprochenen, ausgebreiteten Glomerulitis resp. Glomerulonephritis trugen.

5. Die angeführten Resultate sind unseres Erachtens noch nicht genügend, um daraufhin annehmen zu können, daß die Erkrankung unserer Meerschweinchen einen experimentellen Scharlach vorstellt, doch sprechen die von uns beobachteten Tatsachen für eine gewisse Wahrscheinlichkeit dieser Annahme und regen uns an, unsere Versuche auf diesem Gebiete auch ferner weiterzuführen.

Ende August 1925.

Literaturverzeichnis.

Bernhardt, Dtsch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 17 u. 23. — *Bürgers*, 1. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **93**. 1924; 2. Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 10. — *Bürgers* und *Bachmann*, Arch. f. Hyg. **94**. 1924. — *Cantacouzène*, Compt. rend. de la soc. de biol. **70**. 1911. — *Caronia*, zit. nach *Politzer*. — *di Cristina*, zit. nach *Politzer*. — *Doerr* und *Pick*, Wien. klin. Wochenschr. 1918, Nr. 30. — *Dick, G. F.*, und *G. H. Dick*, Journ. of the Americ. med. assoc. **77**. 1921; **81**. 1923; **82**. 1924. — *Grünbaum*, Brit. med. journ. 1904. — *Hach*, 1. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **104**, 319. 1925. 2. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **256**, 495. 1925. 3. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **104**, 337. 1925. 4. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., dieser Band. — *Hofstaedt*, Med. Klinik 1924, Nr. 18. — *Klimenko*, Jahrb. f. Kinderheilk. **77**. 1913. — *Korschun*, Hygiena i Epidemiologija 1924. Nr. 5 (russ.). — *Landsteiner, Levaditi* und *Prasek*, Ann. de l'inst. Pasteur **25**. 1911. — *Lipschütz*, Handb. der pathol. Mikroorg. v. Kolle und Wassermann, 2. Aufl., Bd. VIII. 1913. — *Otto* und *Dietrich*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **82**, 383. — *Politzer*, Presse méd. 1924, Nr. 104. — *Sindoni*, zit. nach *Politzer*. — *Zlatogoroff, Derkatsch* und *Nasledyschewa*, Verh. des IX. Allruss. Kongr. f. Bakter., Moskau 1925, Wratschebnoje djelo 1925, Nr. 15—17 (russ.) und Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. **97**, 152. 1926.

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch" Berlin.
Abteilungsleiter: Professor Dr. *Boecker*.)

Über grob- und feinflockige Typhusagglutination.

Von
Dr. Fritz Kauffmann,
Assistent am Institut.

Den Ausgangspunkt folgender Untersuchungen bildet die Veröffentlichung von *Weil* und *Felix* „Über den Doppeltypus der Receptoren in der Typhus-Paratyphusgruppe".

Hierin wird berichtet, daß in den künstlichen Immunseren gegen Typhus-, Gärtner-, Paratyphus A und B-Bacillen zwei verschiedene, nämlich grob- und feinflockende, Agglutinine vorhanden sind, wobei die grobflockenden Agglutinine den thermolabilen Receptoren, die feinflockenden den thermostabilen Receptoren der Bacillen entsprechen. Streng spezifisch wären nur die labilen Receptoren, demnach wäre Mitagglutination hauptsächlich durch feinflockende Agglutinine bedingt. Durch Immunisierung mit bei 60° abgetöteten Bacillen erhalte man grob- und feinflockende Seren, durch Immunisierung mit auf 100° C (2 Stunden im Dampftopf) erhitzten Bacillen bei 3 intravenösen Injektionen dagegen nur feinflockende Seren.

Eine weitere Arbeit von *Felix* „Über die Bedeutung der Receptorenanalyse für die Serodiagnostik der typhösen Erkrankungen" bestätigt diese früheren Befunde an menschlichen Seren, wobei betont wird, daß nach Typhusschutzimpfung nur grobflockende Agglutinine entständen.

Schon früher sind bekanntlich die Erscheinungen der grob- und feinflockigen Agglutination, ebenso wie die verschiedene Thermoresistenz der Agglutinogene (und der Agglutinine) Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. So wird in einer Arbeit von *Eisler* und *Silberstein* „Beiträge zur Bakterienagglutination" auf Unterschiede zwischen Feucht- und Trockenbacillen hingewiesen. Auf Trockenagar gezüchtete Typhusbacillen sollen schlechter agglutinabel sein als von Feuchtagar stammende. Die Trockenbacillen enthielten ein kochbeständiges Agglutinogen, das feinflockende Agglutinine liefere, die Feuchtbacillen ein thermolabiles Agglutinogen, das außerdem noch grobflockende Agglutinine liefere. Als Ursache wird der größere Nucleoproteidgehalt der Feuchtbakterien angegeben.

Wohl als erster hat sich *Joos* mit den verschiedenen hitzebeständigen Agglutinogenen und Agglutininen des Typhusserums beschäftigt. *Kraus* und *Joachim* haben die Befunde von *Joos* zwar teilweise bestätigt, ihre Allgemeingültigkeit aber abgelehnt. Ein mit lebenden Bacillen gewonnenes Immunserum enthalte nicht immer beide (grob- und feinflockende) Agglutinine, ein mit erwärmten Bacillen erzeugtes nicht notwendig nur feinflockende Agglutinine. Der Gehalt der Bakterien an Agglutinogenen der groben oder feinen Flockung sei wechselnd; dasselbe Bakterium enthalte, zu verschiedenen Zeiten untersucht, auf verschiedenen Nährböden gezüchtet, einmal mehr, das andere Mal weniger von

dem einen oder anderen Agglutinogen. Mit dem Agglutinationstypus der Ruhrbacillen beschäftigten sich außerdem *Dünner*, *U. Friedemann* und *Steinbock* sowie *Schiemann*; bekanntlich hat *U. Friedemann* als erster auf die diagnostische Bedeutung von groben und kleinen Flocken bei der Agglutination der Ruhrbacillen aufmerksam gemacht.

Unter grobflockiger Agglutination werden große, grobe, lose zusammenhängende, schwammige Flocken verstanden, über denen, meist schon nach 2 Stunden, die darüberstehende Flüssigkeit klar ist und die bereits durch mäßiges Schütteln vollständig in kleinste, feine Teile zerteilt werden. Die feinflockige Agglutination ist durch feinere, kleinere, schärfer konturierte, nicht zerschüttelbare Partikel charakterisiert. Meist handelt es sich um eine Kombination von beiden, die im folgenden stets *„grob- und feinflockig"* genannt wird.

Technik: Je 0,5 ccm Typhusaufschwemmung (meist mit 10—15 ccm NaCl-Lösung ein 24std. Schrägagarröhrchen abgespült) + 0,5 ccm Immunserum 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 usw. 2 Std. Brutschrank 37°, dann Ablesen, weiterer Aufenthalt bei Zimmertemperatur und nochmalige Ablesung nach 24 Stunden.

Zuerst wurden 3 Immunseren hergestellt mit einem frisch aus dem Blut eines Patienten gezüchteten Typhusstamm 515. (Von unserem Typhuspferdeserum wurde dieser Stamm, so wie fast sämtliche Stämme, grob- und feinflockig agglutiniert, und zwar bis zu einer Verdünnung des Immunserums von 1 : 100 000. Das Immunserum ist polyvalent und mit bei 56°, $1^1/_4$ Std. lang, erhitzten Bacillen hergestellt.) Mit diesem Typhus 515 = Stamm, der stets auf feuchtem Schrägagar weitergezüchtet wurde, wurden 3 Kaninchen intravenös immunisiert, Kaninchen 1 mit lebenden Bacillen, Kaninchen 2 mit bei 56° ($1^1/_4$ Std.) abgetöteten Bacillen und Kaninchen 3 mit bei 100° (2 Std. Dampftopf) abgetöteten Bacillen. Beginn mit $^1/_5$ Öse, nach 5 Tagen $^1/_3$ Öse, nach weiteren 5 Tagen $^1/_2$ Öse, nach 10 Tagen Blutentnahme. Alle 3 Seren hatten fast denselben Agglutinationstiter (1 : 6000 +) und agglutinierten den homologen Stamm 515 und einen heterologen Typhusstamm I typisch grob- und feinflockig. Es war also nicht gelungen, mit auf 100° erhitzten Bacillen ein ausschließlich feinflockendes Serum herzustellen. Diese 3 Kaninchen wurden dann mit steigenden Dosen weiter intravenös immunisiert; der Titer stieg bis auf 50—100 000, wobei das Serum, das mit den lebenden Bacillen gewonnen war, den höchsten Titer zeigte.

Alle 3 agglutinierten typisch grob- und feinflockig. Diese 3 Seren wurden nach der 3. Injektion und zum Schluß einzeln und gemischt zum Baktericidieversuch benützt (darüber später).

Da es möglich erschien, daß dieses Ergebnis auf die Besonderheit des verwandten Stammes 515 zurückzuführen war, wurde ein Versuch

mit dem Typhusstamm 901, demselben, den *Weil* und *Felix* zu ihren Versuchen gebraucht haben, angesetzt. Diesen Stamm erhielten wir durch freundliche Vermittlung des Herrn Prof. Dr. *U. Friedemann.* Mit dem Stamm 901, der von unserem Immunserum grob- und feinflockig agglutiniert wurde, ist ein Kaninchen intravenös mit $^1/_2$ Stunde auf 60° erhitzten Bacillen, ein anderes mit 2 Stunden auf 100° im Dampftopf erhitzten Bacillen in derselben Weise, wie oben angegeben, gespritzt worden. Mit diesen Seren hatten wir schwankende Ergebnisse. Einmal agglutinierte das 100°-Serum feinflockig, das 60°-Serum grob- und feinflockig, während derselbe Versuch einige Tage später bei beiden Seren grob- und feinflockig ausfiel.

Mit diesem Stamm 901 wurden 2 weitere Kaninchen, wie vorher, mit 60°- und 100°-Bacillen immunisiert. Diesmal zeigten bei der ersten Prüfung wieder beide Seren ohne Unterschiede sowohl grob- als feinflockige Agglutination. Mit denselben Seren, die im Eisschrank aufgehoben wurden, und demselben Stamm wurden die Versuche häufiger wiederholt, dabei zeigte in einem Versuche das 100°-Serum deutlich schwächere, auf der Grenze zwischen grob- und feinflockig stehende Agglutination. Die meisten Versuche fielen aber gleichsinnig grob- und feinflockig aus; aber auch das 60°-Serum zeigte nicht immer dieselbe grobe Agglutination.

Entsprechend den Agglutinationsversuchen von *Börnstein* mit Proteusbacillen, die auf 0,1% Carbolagar gezüchtet waren, wurden Versuche mit „Typhuscarbolbakterien" (von 0,1% Carbolagarplatten) angesetzt. Sie verliefen entsprechend den Normalbakterien, nur war die Agglutination nicht ganz so grob und der Titer nicht ganz so hoch. Die Typhuscarbolbakterien waren fast unbeweglich.

Die Angaben von *Eisler* und *Silberstein* über Trocken- und Feuchtbakterien konnten mit den Typhusstämmen 901 und 515 nicht bestätigt werden, beide Arten von Bakterien zeigten mit dem 60°- und 100°-Serum deutlich grob- und feinflockige Agglutination. Neben getrockneten Schrägagarröhren (nach der Angabe von *Eisler* und *Silberstein*) wurden Agarplatten benutzt, die 1 Stunde im 60°-Schrank getrocknet waren. Ob der Trocknungsgrad der Platten und Röhrchen in unseren Versuchen dem von *Eisler* und *Silberstein* entspricht, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen.

Die großen Erfahrungen an menschlichen Typhusseren (laufendes Material am Untersuchungsamt, jährlich mindestens 1000 *Gruber-Widal*sche Reaktionen) lassen sich dahin zusammenfassen, daß durcheinander sowohl grob- und fein- wie nur feinflockende Seren vorkommen. Versucht man diese Erscheinung näher zu analysieren, so kann man folgendes feststellen: Zu unseren Widalschen Reaktionen werden 2 verschiedene Typhus-, 2 verschiedene Paratyphus B- sowie ein Para-

typhus A-Stämme benutzt. Von diesen Stämmen wird der eine Typhusstamm (I) meist gröber und stärker als der andere (II), ebenso der eine B-Stamm gröber als der andere agglutiniert. Der Typus der Agglutination ist also sehr abhängig vom Stamm, aber nicht allein; denn haben wir z. B. an einem Tage 4 Widalreaktionen, die für Typhus positiv sind, so geben z. B. 2 davon mit Typhus I typische grobe, die 2 anderen mit Typhus I feine Agglutination, obwohl die Aufschwemmung dieselbe ist. Der Typ der Agglutination ist also sowohl abhängig vom Stamm als auch vom Serum.

Schließlich muß noch an Hand unseres großen Materials der Behauptung widersprochen werden, daß die Mitagglutination fast nur feinflockig sei. Als Beispiele, die beliebig vermehrt werden können, seien nur folgende angeführt:

Widal Nr. 2975 vom 9. VII. 1925. Ausagglutination:

Typhus . . . . . 400 ++ sehr grob, 800, 1600 +, 3200 ±
Paratyphus B . . 400 ++ „ „ , 800 +, 1600 ±, 3200 —
„ A . . 100 ++ „ „ , 200 +, 400 ±, 800 —.

Aus dem Blut (Galle) Typhusbacillen nachgewiesen.

Widal Nr. 3030 vom 10. VII. 1925:

Typhus . . . . . 200 ++ sehr grob
„ B . . . . 50 ++ „ „ , 100 +, 200 ±
„ A . . . . 50 ++ „ „ , 100 +, 200 ±.

Im Stuhl Typhusbacillen nachgewiesen.

Widal Nr. 3045 vom 10. VII. 1925:

Typhus . . . . . 200 ++ sehr grob,
„ B . . . . 100 ++ „ „ , 200 +,
„ A . . . . 50 ++ „ „ , 100 +, 200 ±.

Im Stuhl und Urin Typhusbacillen nachgewiesen.

Ja es kommen sogar vereinzelte Fälle vor, wo die Typhusagglutination bis 200 + ist, ohne grob zu sein, während die B-Mitagglutination nur bis 50 sehr grob und bei 100 negativ ist. Jedenfalls kann aus dem Typus der Agglutination bei Typhus und Paratyphus nicht die Diagnose gestellt werden.

Auch daß nach Typhusschutzimpfung mit dem gewöhnlichen 56°-Impfstoff nur grobflockige Agglutination auftritt, ließ sich an einem Typhusschutzgeimpften (Dr. *L.*) nicht bestätigen; das 10 Tage nach der 3. Schutzimpfung entnommene Serum zeigte typische, feinflockige Agglutination.

Wenn unsere Ergebnisse von denen oben genannter Autoren abweichen, so wollen wir natürlich nicht die Richtigkeit ihrer Beobachtungen bezweifeln, sondern nur betonen, daß man daraus vorläufig keine allgemein gültigen Schlüsse ziehen darf. Die Verhältnisse liegen offenbar recht verwickelt und bedürfen weiterer Klärung.

Schlußsätze.

Entgegen den Angaben von *Weil*, *Felix*, *Olitzki* u. a. ist es uns auch bei Benutzung des von *Felix* selbst verwandten Typhusstammes nicht gelungen, durch Vorbehandlung von Kaninchen mit auf 100° erhitzten Typhusbacillen ein Serum herzustellen, das ausschließlich feinflockige Agglutination ergab. Gelegentlich trat eine solche allerdings ein, in der Regel wurde aber in jedem Versuch grob- und feinflockige Agglutination nebeneinander beobachtet. Ob grobe oder feine Häufchen gebildet werden, hängt offenbar nicht nur von der Beschaffenheit des Serums, sondern auch von der Kultur ab, wie das für die Ruhragglutination schon *Schiemann* nachgewiesen hat. Auch unter unseren Typhusstämmen fanden wir solche, die bei den täglichen Widal-Proben überwiegend grobe, andere, die überwiegend feine Flocken bildeten; vor allem aber kann das Verhalten desselben Stammes in dieser Hinsicht von Tag zu Tag wechseln.

Ebensowenig konnte die Angabe von *Eisler* und *Silberstein* bestätigt werden, wonach auf Trockenagar gewachsene Typhusbacillen ausschließlich feinflockig agglutinieren sollen; in unseren Versuchen verhielten sie sich nicht anders als die gleichen auf feuchtem Agar gezüchteten Stämme. Auch das von *Eisler* und *Silberstein* beschriebene Verhalten ist also offenbar nicht regelmäßig anzutreffen. Nach zahlreichen Beobachtungen ist es durchaus wahrscheinlich, daß bei der Agglutination verschiedene Antigene beteiligt sind, die sich u. a. auch in ihrer Thermoresistenz unterscheiden, zu deren Trennung wir aber bisher kein sicheres Verfahren in der Hand haben.

Literaturverzeichnis.

Börnstein: Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **91**, 403. — *Dünner*, Berl. klin. Wochenschr. 1915, Nr. 46, S. 1184. — *Eisler* und *Silberstein*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**, 267. — *Felix*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **39**, 127. — *Felix* und *Olitzki*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 2, S. 72. — *Friedemann* und *Steinbock*, Dtsch. med. Wochenschr. 1916, S. 215. — *Joos*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **33**, 762. — *Kraus* und *Joachim*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **36**, 662; **37**, 73. — *Schiemann*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **82**, 405. 1916. — *Schiff*, Münch. med. Wochenschr. 1919, S. 152. — *Weil* und *Felix*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **29**, 24.

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ Berlin.
Abteilungsleiter: Professor Dr. *Boecker*.)

Untersuchungen über den bactericiden Reagensglasversuch, mit besonderer Berücksichtigung des Typhus.

Von
Dr. Fritz Kauffmann.
Assistent am Institut.

Die folgenden Untersuchungen nehmen eine kurze vorläufige Mitteilung von *Felix* und *Olitzki* in der Klinischen Wochenschrift „Serumbactericidie und qualitative Receptorenanalyse“ zum Ausgangspunkt und stehen im Zusammenhang mit der vorstehenden Arbeit „Über grob- und feinflockige Typhusagglutination“. *Felix* und *Olitzki* haben die in obiger Arbeit besprochenen Befunde der grob- und feinflockenden Agglutinine in Beziehung zur Bactericidie des Serums gesetzt. Sie geben an, daß nur die feinflockenden Agglutinine mit den bactericiden Antikörpern „identisch“ seien, während die grobflockenden Agglutinine für die Bactericidie keine Bedeutung hätten. Eine Nachprüfung dieser Angaben erfordern zunächst Untersuchungen über die Verschiedenheit der Immunsera, je nach der Herstellung. Dabei stellte es sich heraus, daß es nicht gelingt, regelmäßig grobflockende und feinflockende Seren getrennt zu erhalten. Wir sind jedenfalls nicht im Besitze eines immer gleichmäßig feinflockenden Immunserums (siehe vorstehende Arbeit). Ferner mußten sich die Untersuchungen auf die Frage der Zuverlässigkeit der angewandten Bactericidiemethode (Plattenversuch nach *Neisser-Wechsberg*) erstrecken; diese bildet den Gegenstand vorliegender Mitteilung. Die Angaben von *Neisser-Wechsberg* sind einerseits vielfach bestätigt worden (genaue Darstellung von *Sachs* in: *Kraus-Uhlenhuth*, Handbuch der mikrobiologischen Technik), andererseits ist aber unseres Wissens nirgends mitgeteilt worden, wie außerordentlich unregelmäßig diese Versuche ausfallen. Unter anderem enthalten die Arbeiten von *Neufeld* und *Hüne*: „Untersuchungen über bactericide Immunität und Phagocytose, nebst Beiträgen zur Frage der Komplementablenkung“, sowie die Arbeit von *Hüne* „Untersuchungen über Bactericidie im Reagensglas“, zahlreiche Protokolle über positive Typhus- und Cholerabactericidieversuche, während die Autoren eine bactericide Wirkung gegenüber Paratyphus B-Bacillen weder

in vitro noch in vivo nachweisen konnten. Dem stehen sehr zahlreiche, nicht veröffentlichte Bactericidieversuche aus dem *Neufeld*schen Laboratorium 1917/1918 mit Typhus, Shiga-Ruhr und Cholera gegenüber, die größtenteils völlig negativ verlaufen sind.

Unseren Versuchen liegt die Technik von *Neisser* und *Wechsberg* in der von *Neufeld* und *Hüne* angegebenen Form zugrunde: 0,5 ccm Serumverdünnung 1 : 10 bis 1 : 10 Millionen in physiologischer NaCl-Lösung + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 in NaCl-Lösung + 0,5 ccm Typhusaufschwemmung, enthaltend $^1/_{200\,000}$ Öse in 1 : 6 verdünnter Bouillon. Nach 3stündigem Brutschrankaufenthalt (37° C) werden Agarplatten gegossen und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Dieselben Resultate hat man bei folgender Dosierung:

1 ccm Typhusaufschwemmung in Bouillon 1 : 6 = $^1/_{100\,000}$ Öse + 1 Tropfen Serumverdünnung 1 : 10 bis 1 : 10 Millionen in NaCl-Lösung + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 verdünnt.

Untersucht wurden folgende Seren:

a) Die in vorstehender Arbeit erwähnten 3 Kaninchenseren, gewonnen durch Immunisierung mit lebenden, 56°- und 100° C-Typhus 515 Bacillen, einzeln und gemischt, nach der 3. Injektion sowie nach Schluß der Immunisierung gewonnen.

b) 1 Serum von 1 Kaninchen, das ebenfalls mit lebenden Typhus 515-Bacillen intravenös und 1 Serum von 1 Kaninchen, das mit lebenden Typhus 515-Bacillen intraperitoneal gespritzt wurde. (Dieses letzte Serum agglutinierte ebenfalls grob- und feinflockig.)

c) Je 1 Kaninchenserum, das mit Typhus 901, auf 60° C erhitzt und auf 100° C erhitzt, gewonnen war.

d) 2 menschliche Krankenseren mit Agglutinationstiter 1 : 200 + sowie 2 Typhusrekonvaleszentenseren von hohem Titer 1 : 1600 +.

Die ersten Versuche mit diesen sämtlichen Seren fielen meist negativ aus oder zeigten nur eine geringe, ein wenig über die Komplementwirkung hinausgehende bactericide Wirkung. Dann traten plötzlich meist positive Ergebnisse auf, ohne erkennbare Ursache, unter anscheinend genau denselben Bedingungen wie vorher. In einzelnen Versuchen wurde vollkommene Sterilität der Platten 1: 100—1: 10 000 erreicht, meist waren aber noch 10—50 Keime vorhanden, wobei das Komplement allein bis auf 1000 oder 2000 Keime abtötete (Kulturkontrolle: unendlich viel Keime). Diese Ergebnisse blieben aber nicht konstant, zwischendurch kamen immer wieder ganz oder teilweise negative Versuche vor. Um zu einem konstant positiven Ergebnis zu kommen, wurden die verschiedensten Modifikationen der Technik angewandt.

1. Serumverdünnungen:

a) 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 usw.

b) 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 . . . in 1 : 1 Milliarde in einer Menge von 0,5, 1,0, 1,5 ccm.

2. Frisches Meerschweinchenkomplement 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, Dosis 0,5 ccm und Kaninchenkomplement.

Auch 24 Stunden altes Komplement wurde einige Male verwandt.

Als geeignetste Dosis des Meerschweinchenserums stellte sich 0,5 ccm 1 : 10 verdünnt heraus, hierbei ergab die Komplementkontrolle im allgemeinen 1000 bis 3000 Keime gegenüber „unendlich“ der Kulturkontrolle.

3. Als Typhuskulturen dienten meist die homologen Stämme 515 und 901, ferner ein von einem Dauerausscheider stammender sehr alter Laboratoriumsstamm Grätz sowie ein frischer Stamm 735.

Die meisten Versuche wurden mit Bakterien gemacht, die auf Pferdefleischagar (7,4 p_H) im Schrägröhrchen 24 Stunden gewachsen waren. Es wurden aber auch Versuche gemacht mit Pferdefleischagar von 7,8 und 8,1 p_H und Rinderfleischagar von 7,4 p_H, Carbolagar 0,1%, Traubenzuckeragar 0,5%, Rinderbouillon 7,4 p_H und schließlich mit Trocken- und Feuchtbacillen. Als Verdünnungsflüssigkeit wurde physiologische NaCl-Lösung, Bouillon 1 : 6 und unverdünnte Bouillon benutzt, und zwar in 0,5 ccm $^1/_{2000}$, Öse $^1/_{20000}$ Öse, meist $^1/_{200000}$ Öse, auch $^1/_{500000}$ Öse.

Bebrütung 1, 2, 3, 6, 8, 24 Stunden, meist 3 Stunden. Platten gegossen mit 15 ccm Rinder- und Pferdefleischagar von 7, 4, 7, 8 und 8,1 p_H.

Mit keiner dieser Modifikationen gelang es uns, regelmäßig positive Resultate zu erhalten.

Es ließ sich bestätigen (*Neufeld* und *Hüne*), daß Bacillen 1:6 als Verdünnungsflüssigkeit der Kultur am geeignetsten ist. Mißt man die bactericide Wirkung des Komplements allein an einer Typhuskultur,

1. Aufschwemmung in 0,85% NaCl-Lösung,
2. Aufschwemmung in Bouillon 1: 6,
3. Aufschwemmung in Bouillon unverdünnt,

so ist bei Bouillon 1: 6 die bactericide Wirkung des Komplementes etwa 10 mal so stark wie bei 1. und 3.; d. h. dieselbe Komplementverdünnung hat bei 2. 10 mal soviel Keime abgetötet als bei 1. und 3.

Ich gebe nun nebenstehend aus meinen sehr zahlreichen Protokollen ein Beispiel des verschiedenen Ausfalles des Bactericidieversuches mit dem *gleichen* Serum und *derselben* Kultur an verschiedenen Tagen.

Zur Aufklärung der unregelmäßigen Plattenbactericidieversuche nach der *Neisser-Wechsberg*schen Methode wurde, entsprechend der ebenfalls von *Neisser* und *Wechsberg* angegebenen Methylenblaumethode zum Nachweis bactericider Stoffe, die Nitroantrachinonreduktionsmethode herangezogen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß durch die Bakterien das fast farblose „Nitroantrachinon zu biologischen Zwecken“ der Höchster Farbwerke zu dem roten Aminoantrachinon reduziert wird. Das Reduktionsverfahren eignet sich besonders gut zum Nachweis geringster, auch partieller Schädigungen des Bakterienleibes; ein Verfahren, das besonders *Schnabel* als Methylenblaumethode zur „Bestimmung zell- und keimschädigender Substanzen in dünnen Lösungen auf biologischem Wege“ ausgearbeitet hat. Alle diese Untersuchungen, auch diejenigen *Bielings* mit der Nitroantrachinonmethode, fußen auf den grundlegenden Arbeiten von *Lipschitz* und seinen Mitarbeitern. Mit Hilfe dieser empfindlichen Reduktionsmethode konnte man hoffen, einen besseren Einblick in den Ablauf der Bactericidie zu gewinnen, zumal neuerdings Befunde über die Wirkung des *d'Hérelle*schen Lysins auf die Reduktion der Colibacillen

Typhus 515 Rinderschrägagar nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C, mit Bouillon 1 : 6 verdünnt, 0,5 ccm = 1/200000 Öse. + 0,5 Meerschweinchenkomplement 1 : 10 + 0,5 Typhus-Kaninchenserum 515 1 : 10 bis 1 : 10 Millionen 3 Stunden 37° C, Platten gegossen. 24 Stunden 37° C.

	11. III. 1925 negativ	21. III. 1925 positiv	17. III. 1925 schwach positiv
1. 0,5 ccm Kultur + 1,0 ccm NaCl-Lösung . .	∞	∞	∞
2. 0,5 „ „ + 0,5 „ NaCl-Lösung + 0,5 ccm Serum 1 : 10	∞	∞	∞
3. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm NaCl-Lösung + 0,5 ccm Komplement 1 : 10	Tausende	Tausende	Tausende
4. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1: 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 10	∞	∞	∞
5. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 100	∞	∞	∞
6. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 1000.	Tausende	100	Hunderte
7. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 10 000	„	10	„
8. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 100 000	„	15	„
9. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 1 Million	„	10	„
10. 0,5 ccm Kultur + 0,5 ccm Komplement 1 : 10 + 0,5 ccm Serum 1 : 10 Millionen	„	200	„
11. 0,5 ccm Serum 1 : 10 + 1,0 NaCl	steril	steril	steril
12. 0,5 ccm Komplement + 1,0 NaCl	„	„	„

vorliegen (*Kauffmann*), die eine ganz typische Linie der *Reduktionssteigerung* und der Reduktionshemmung ergaben.

Es sei vorweg bemerkt, daß bei allen Serumbactericidieversuchen niemals eine Reduktionssteigerung aufgetreten ist, sondern nur eine Reduktionshemmung (eine Bestätigung der *Bieling*schen Versuche). Damit es zur Reduktionshemmung kommt, ist eine genügend kleine Einsaat erforderlich, am besten 1/100 000 Öse pro ccm bei Typhus. Normalsera, auch frisches Komplement, übten in meinen Versuchen niemals eine sichtbar hemmende Wirkung aus. Der hierbei zutage tretende Unterschied zwischen der Komplementkontrolle beim Plattenversuch und der beim Reduktionsversuch, wobei beim Plattenversuch eine deutliche hemmende Wirkung des Komplementes auftritt, beruht auf folgendem: Beim Plattenverfahren ist das Ergebnis der Bactericidie nach 3 Stunden festgehalten. Beim Reduktionsverfahren, bei der zur Bactericidie notwendigen geringen Bacilleneinsaat, ist dagegen nach 3–8 Stunden noch nirgends eine Reduktion sichtbar. Das Resultat wird erst nach 24 Stunden ablesbar; und so entzieht sich die zweifellos vorhandene bactericide Wirkung des Komplements unserer Beobachtung.

Beispiel eines Reduktions- und Plattenbactericidieversuches:

Versuch vom 22. X. 1925. 24stündige Typhus 515-Schrägagarkultur.

I. Je 1 ccm = $^1/_{100000}$ Öse in Bouillon 1 : 6 + 1 Tropfen Typhus-Kaninchenserum 515 unverdünnt bis 1 : 1 Milliarde + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Nitroantrachinon 1 : 100 24 Stunden 37° C Schrank.

II. Dasselbe mit und ohne Nitroantrachinon 3 Stunden 37° C Schrank. Platten gegossen. 24 Stunden 37° C.

	I.	II.	III.*
1. 1 ccm Ty. + 2 Tropfen NaCl	rot	∞	∞
2. 1 „ Ty. + 1 „ NaCl + 1 Tropfen Serum unverdünnt	„	∞	∞
3. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen NaCl + 1 Tropfen Komplement 1 : 2	„	1000	∞
4. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum unverdünnt	„	∞	∞
5. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 10	farblos	50	Tausende
6. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 100	„	20	Einzelne
7. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 1000	„	50	Hunderte
8. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 10 000	„	20	Einzelne
9. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 100 000	„	20	„
10. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 1 Million	„	20	∞
11. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 10 Millionen	„	20	∞
12. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 100 Millionen	„	20	∞
13. 1 ccm Ty. + 1 Tropfen Komplement 1 : 2 + 1 Tropfen Serum 1 : 1 Milliarde	„	20	∞

* Reihe I nach 24 Stunden zu Platten gegossen. 24 Stunden 37° C. Hieraus geht hervor, daß Reduktionshemmung nicht gleichbedeutend ist mit Abtötung.

Die Versuche mit der Nitroantrachinonreduktion ergaben bei Verwendung von Typhuskultur stets ein deutlich positives Resultat; es gab keine Versager wie beim Plattenverfahren, nur waren nach 24 Stunden nicht immer Röhrchen 5—13 farblos, sondern nur 5—9 oder 10, während 10—13 rötlich oder rot waren. Einerseits ist das Reduktionsverfahren also dem Plattenverfahren an Empfindlichkeit überlegen, es kommt stets in einem gewissen Bezirk zu kompletter Hemmung, die im Plattenverfahren selten ist, andererseits lassen sich graduelle Unterschiede besser durch Auszählung beim Plattenverfahren feststellen.

Es lag nahe, diese Methode zur praktischen, serologischen Typhusdiagnose heranzuziehen. Dies geschah in der oben beschriebenen Weise

(wie bei den Immunseren) und gab bei einer Anzahl menschlicher Seren mit positiver Widal-Reaktion deutliche Ausschläge. Bei weiteren Untersuchungen stellten sich aber folgende Tatsachen heraus, die das Verfahren für die Praxis illusorisch machten:

1. *Die reduzierende Wirkung von Typhus-Paratyphus-A- und Ruhrbacillen wird durch Immunseren, welche durch Vorbehandlung von Pferden oder Kaninchen mit Typhus-, Paratyphus-A- und -B- sowie von Ruhr-Bacillen genommen wurden, in grundsätzlich gleicher Weise gehemmt.*

2. *Paratyphus B wird weder von seinem homologen B-Immunserum noch von den anderen Seren irgendwie beeinflußt.*

Diese Befunde (1 und 2) finden ihre Bestätigung in den entsprechenden Plattenbactericidieversuchen, die gleichsinnig ausfallen. Normalseren wirken auf die Reduktion des Nitroantrachinon durch Typhus-, Paratyphus- und Ruhrstämme nicht hemmend ein.

Coliimmunseren von hohem Agglutinationstiter zeigten keine bactericiden Eigenschaften, sowohl im Platten- wie im Reduktionsverfahren. Dagegen haben in beiden Verfahren den höchsten bactericiden Titer Choleraimmunsera gegen Choleravibrionen.

Mit Hilfe des Nitroantrachinonreduktionsverfahrens ist es gelungen, zu demonstrieren, daß im Typhusimmunserum tatsächlich Antikörper enthalten sind, die reduktionshemmende Eigenschaften haben; es ist dagegen nicht gelungen, das Versagen der Plattenbactericidieversuche zu klären.

Schlußsätze.

Beim bactericiden Plattenversuch mit Typhusbacillen nach *Neisser-Wechsberg* treten sehr große Schwankungen auf. Der Versuch fällt sehr häufig völlig negativ aus, obwohl dieselben Stämme mit denselben Seren (bisweilen bis zur Verdünnung von 1 : 1 Milliarde herab) zu anderer Zeit starke Bactericidie zeigen. Dieser unregelmäßige Ausfall ist überwiegend, vielleicht ausschließlich durch Schwankungen der Kulturen bedingt, wobei offenbar Verschiedenheiten des Nährbodens eine große Rolle spielen.

Neben dem Plattenversuch nach *Neisser-Wechsberg* wurde die Beobachtung der Reduktionshemmung herangezogen, eine Methode, die es ermöglicht, geringe Beeinträchtigung der Lebenstätigkeit der Bakterien festzustellen. Diese Methode ergab in unseren Versuchen mit Typhusbacillen stets positive Ausschläge, wobei in einer bestimmten Zone (in der Regel bei Serumverdünnungen von 1 : 1000—1 : 1 Million) die Reduktion vollständig gehemmt war.

Dafür, daß diese Methode in der Tat eine Hemmung der Lebenstätigkeit der Bakterien durch das Bacteriolysin, d. h. durch vereinte Wirkung von Amboceptor und Komplement anzeigt, sprechen folgende

Beobachtungen. Bei den Typhusversuchen bleibt die Reduktionshemmung in derselben Zone aus, wo im Versuch nach *Neisser-Wechsberg* anstatt der Bactericidie eine Komplementablenkung auftritt. Bei den von uns untersuchten Paratyphus-B- und Coliantiseren fiel sowohl der Platten- wie der Reduktionsversuch mit den zugehörigen Bakterien stets völlig negativ aus; diese Seren enthielten also offenbar keine bactericiden Amboceptoren für die homologen Erreger. Dagegen enthalten Immunsera, welche durch Vorbehandlung mit Typhus-, Paratyphus-A-, Paratyphus-B- oder Ruhrbacillen gewonnen sind, solche Amboceptoren für alle genannten Erreger mit Ausnahme des Paratyphus B, der einer spezifischen Bactericidie nicht zugänglich zu sein scheint; auch diese auf fremde Stämme übergreifenden (Gruppen-)Antistoffe lassen sich sowohl im Platten- wie im Reduktionsversuch nachweisen.

Literaturverzeichnis.

Bieling, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**, 270. — *Felix* und *Olitzki*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 2, S. 72. — *Hüne*, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt **26**, 196. — *Kauffmann*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **106**, 241. — *Sachs*, Kraus-Uhlenhuth, Handbuch der mikrobiologischen Technik. — *Neufeld* und *Hüne*, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt **25**, 165. — *Neufeld* und *Lindemann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, Ref. **54**, Beiheft, S. 229 (6. Tagung d. p. Verein. f. Mikrobiol.) 1912. — *Schnabel*, Biochem. Zeitschr. **108**, 258.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel. — Vorsteher: Professor *R. Doerr.*)

Zur Chemie der bakteriellen Toxine.

II. Mitteilung.

Von

K. Kellenberger.

C. Hallauer hat in einer jüngst erschienenen Mitteilung (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., **105**, 138) das von *Doerr* zuerst beschriebene *Phänomen der Inaktivierung (Entgiftung) bakterieller Toxine durch stark dissoziierte Säuren und ihrer Reaktivierung durch Wiederherstellung der ursprünglichen Wasserstoffionenkonzentration* genauer zu analysieren versucht und gelangte zu dem Schlusse, daß diese merkwürdige Erscheinung höchstwahrscheinlich als ein *chemischer* Prozeß, und zwar als eine *intramolekulare Umlagerung*, zu betrachten sei. Die Bakteriengifte, denen man in Anbetracht ihrer Antigenfunktionen eine *cyclische Atomgruppierung* zuschreiben darf, sind bekanntlich äußerst unbeständige Verbindungen; nimmt man an, daß an dieser Instabilität auch die im Toxinmolekül vorhandenen Ringsysteme partizipieren, so liegt im Hinblick auf die Ergebnisse der neueren Eiweißchemie die Vorstellung nahe, daß die Entgiftung bakterieller Toxine auf einer *Umwandlung der cyclischen in offene Ketten* beruht, und daß umgekehrt die Reaktivierung den physiologischen Ausdruck der Rückverwandlung dieser offenen in ringförmige Atomgruppierungen darstellt. Als wesentlichste Stütze dieser Hypothese führte *Hallauer* die Tatsache an, daß sich bei der Inaktivierung durch Säuren und bei der nachfolgenden Reaktivierung durch Zusatz äquivalenter Alkalimengen nicht nur die Giftigkeit der Toxine (toxischen Bouillonkulturfiltrate) ändert, *sondern daß auch die Antigenfunktion, gemessen an der aktiv immunisierenden Wirkung, eine gleichgerichtete Ab- bzw. Zunahme erkennen läßt*; angesäuerte Lösungen von Dysenterietoxin immunisieren nicht oder doch weit schwächer als die nativen Ausgangsgifte, und nach der Abstumpfung der Säure kehrt gleichzeitig mit der Toxizität auch das Immunisierungsvermögen wieder zurück. Diese Feststellung ist in doppelter Hinsicht von Bedeutung. Zunächst bildet sie eines der Fundamente der von *Hallauer* vertretenen Theorie; daß das Vorhandensein aromatischer Kerne für die biologischen Wirkungsqualitäten notwendig ist, können wir nämlich *nur für die Antigenfunktion* mit größerer Sicherheit behaupten, während uns die chemischen Grundlagen *der Giftigkeit*

bakterieller Toxine vollständig unbekannt sind. Zweitens aber treten die durch Säuren erzielbaren Veränderungen der Toxine eben durch die erwähnte Feststellung in einen bemerkenswerten *Gegensatz zu einer anderen Gruppe von chemischen Toxinmodifikationen*, deren gemeinsames Kriterium darin zu sehen ist, daß sich ein *irreversibler* Verlust der Toxizität mit dem *Erhaltenbleiben der Antigenfunktion* kombiniert. Toxinderivate der letztgenannten Art, welche man als *Toxoide* oder *Atoxine* (*S. Fränkel*, *Ramon*) zu bezeichnen pflegt, und die für die Frage der aktiven antitoxischen Schutzimpfungen praktische Wichtigkeit besitzen, lassen sich durch die verschiedensten Agenzien (Jod, Formaldehyd, längere Lagerung usw.) darstellen; ihre Existenz hat zu der Ansicht geführt, daß die chemischen Träger der Toxizität und der Antigenfunktion im Toxinmolekül verschieden und voneinander weitgehend unabhängig sind, da es so leicht gelingt, die Giftwirkung auszulöschen, ohne die immunisatorischen Eigenschaften zu zerstören. Man hat sogar die Möglichkeit erwogen, daß die Toxine keine einheitlichen Verbindungen im Sinne der organischen Chemie repräsentieren, die in ihrem komplizierten Molekül zwei verschiedene biologisch aktive Atomgruppierungen (die „toxophore" und die „haptophore" nach der *Ehrlich*schen Terminologie) enthalten, *sondern daß einfach ein giftiger, nichtantigener Stoff mit einem atoxischen antigenen Protein* (im nativen Toxin) *in rein adsorptiver Weise gekuppelt ist*; die Substanzen, welche wir Toxine nennen, wären somit Komplexe, deren beide Komponenten nicht durch einen molekularen Verband, sondern durch physikalische Affinitäten aneinander gekettet erscheinen (vgl. *H. Gideon Wells*, The chemical aspects of immunity, 1925, S. 43). Diese Auffassung ist jedoch unseres Erachtens nicht haltbar; akzeptiert man dieselbe, so wird es unverständlich, warum der nach Zerstörung des giftigen Bestandteiles verbleibende Rest im Organismus Antikörper produziert, welche eben diesen toxischen Anteil zu neutralisieren vermögen. Man darf sich hier keineswegs auf das Beispiel der *Lipoide* berufen. Es ist allerdings durch die Untersuchungen von *Landsteiner*, *Sachs*, *Doerr* und ihren Mitarbeitern bewiesen worden, daß Lipoide die ihnen fehlende immunisatorische Fähigkeit erwerben, wenn man sie mit Eiweißantigenen kombiniert, und die Experimente von *Doerr* und *C. Hallauer* haben es sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Verbindung von Lipoid und Protein, die dabei zustande kommt, nicht chemischer, sondern *physikalischer* Natur ist. Aber gerade diese Verhältnisse lassen sich auf die Toxine bei näherem Zusehen nicht übertragen. Nach parenteraler Zufuhr der Lipoideiweißgemenge entstehen nicht ein einziger, sondern *zwei* Antikörper, die in den betreffenden Immunsera unabhängig voneinander koexistieren, und von denen der eine spezifisch auf das Lipoid, der andere auf das Protein eingestellt ist (*Doerr* und *C. Hallauer*). Der Fall

liegt somit offenbar ganz anders wie bei den chemischen Trägern der Toxizität und der Antigenfunktion der bakteriellen Gifte; hier werden wir den Tatsachen am besten gerecht, wenn wir die nativen Toxine als *chemische Individuen* betrachten, die so aufgebaut sind, *daß Toxizität und Antigenfunktion zwar durch besondere, aber in einem Molekül vereinte Atomgruppierungen bedingt erscheinen.* Die Begründung dieser auf *P. Ehrlich* zurückdatierenden Theorie müßte zweifellos an Sicherheit gewinnen, wenn es gelänge, ein Agens ausfindig ausfindig zu machen, das beide Wirkungsqualitäten der Toxine in gleicher Richtung beeinflußt, ohne sie jedoch definitiv aufzuheben; die letzte Forderung muß gestellt werden, da es sich ja sonst um eine vollständige Zerstörung bzw. Aufsplitterung des Toxinmoleküls handeln könnte. Es ist ohne weiteres klar, daß die Beobachtungen von *C. Hallauer* diese Lücke ausfüllen; durch Säuren wird — wie oben betont — nicht nur die Giftigkeit, sondern auch das Immunisierungsvermögen der Toxine ausgelöscht bzw. stark reduziert, und dieser Effekt kann nicht auf einer Zertrümmerung des Toxinmoleküls beruhen, da sonst die Regeneration der ursprünglichen biologischen Aktivitäten durch Neutralisation der Säure ausgeschlossen wäre.

Die beiden vorstehend diskutierten hypothetischen Prämissen (Einheitlichkeit des Toxinmoleküls, Bildung der unwirksamen, aber reversiblen Toxinderivate durch intramolekulare Umlagerung) gestatten aber noch eine weitere, experimentell verifizierbare Ableitung; sollen sie nämlich richtig sein, so müßten die zwei Wirkungsqualitäten der nativen Toxine bei der Inaktivierung durch Säuren und bei der Reaktivierung durch Alkali nicht nur *gleichsinnig*, sondern auch *gleichmäßig* verändert werden, d. h. es müßte zwischen ihnen in allen Phasen des Vorganges *ein quantitativer Parallelismus* bestehen. Wenn also z. B. die tödliche Minimaldosis einer Dysenteriegiftlösung nach dem Zusatze von Salzsäure auf das 100fache ihres ursprünglichen Wertes ansteigt, so sollte auch die Dosis immunisans minima um denselben Betrag zunehmen; das gleiche hätte mutatis mutandis für die Ergebnisse der Titrierung der durch Alkali regenerierten Giftlösung zu gelten. Vollzieht sich der fragliche Übergang der Ringsysteme in offene Ketten in je 99 von 100 identisch konfigurierten Toxinmolekülen, und führt dieser Prozeß de facto zum (reversiblen) Verlust *beider* Wirkungsqualitäten, so ist ein anderes Versuchsresultat gar nicht zu erwarten. *C. Hallauer* hat zwar darauf hingewiesen, daß ein quantitativer Parallelismus der bezeichneten Art im Sinne der von ihm aufgestellten Hypothese eine Notwendigkeit darstellt, konnte sich jedoch aus äußeren Gründen nicht mit der experimentellen Prüfung dieser Angelegenheit befassen. Es erschien daher zunächst von Interesse, in der gedachten Richtung ergänzende Versuche anzustellen.

I.

Die Ausführung der betreffenden Experimente stieß auf erhebliche Schwierigkeiten. Schon die annähernd sichere Ermittelung einer tödlichen *Minimaldosis* ist für toxische Dysenteriebouillonkulturfiltrate kaum möglich; indes kann man sich hier so helfen, daß man statt der Dosis minima *die Dosis certe letalis* als Maßstab bzw. als Maßeinheit wählt (*Doerr*, *R. Zangger*, *Zdansky* und *B. M. Herzog*, *O'Brien* und seine Mitarbeiter). Die titrierende Bestimmung der Dosis immunisans minima läßt sich dagegen nicht auf diesem Wege erledigen und hat mit Umständen zu kämpfen, die in der Natur der Fragestellung begründet sind. Man kann die Tiere (Kaninchen) mit den auf ihre aktiv immunisierende Wirkung zu untersuchenden, sehr kleinen Dosen der Giftlösungen nur *ein einziges Mal* injizieren, und es ist bekannt, daß sich nach solchen einmaligen Einspritzungen minimaler Antigenmengen nur eine geringgradige antitoxische Immunität entwickelt, die überdies erst *nach einer langen Inkubationsperiode* in Erscheinung tritt. Ein Teil der Kaninchen geht zugrunde, bevor noch ihr Immunitätszustand untersucht werden kann; und bei den überlebenden darf man die Prüfungsdosis nicht zu hoch bemessen, da sonst eine tatsächlich vorhandene, aber nur *partielle* Immunität ganz verdeckt wird. Nach mehrfachen vergeblichen Bemühungen ist es indes doch geglückt, diese Hindernisse zu überwinden, wie die folgenden Tabellen erkennen lassen.

A. **Natives Toxin „α"** (22tägige Bouillonkultur des Shiga-Kruse-Stammes „Dys. A", filtriert durch Reichelkerzen; p_H des Filtrates = 7,6, elektrometrisch und mit Farbindicatoren bestimmt).

α) *Toxizität* (intravenöse Injektion steigender Dosen bei Kaninchen von 1500 g Lebendgewicht):

Dosis:	Resultat:
0,0005 ccm	0
0,001 „	0
0,01 „	0
0,025 „	0
0,05 „	0
0,05 „	† (bedeutet Exitus des Versuchstieres innerhalb weniger Tage)
0,05 „	0
0,05 „	0
0,05 „	0
0,07 „	Lähmungen, erholt sich, überlebt.
0,07 „	†
0,07 „	†
0,07 „	†
0,07 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†

Als **Dosis certe letalis** hatte sich somit **0,1 ccm** ergeben.

β) Immunisierende Wirkung. (Kaninchen von 1500 g wurden mit steigenden Dosen des nativen Toxins intravenös vorbehandelt und nach 30 Tagen mit der knapp letalen Dosis derselben Giftlösung, nämlich mit 0,07 ccm iv. reinjiziert):

Immunisiert mit Toxin α:	Reinjiziert nach 30 Tagen mit 0,07 ccm derselben Giftlösung:
0,005 ccm	†
0,001 „	†
0,005 „	Immun
0,01 „	„
0,025 „	„
0,05 „	„
0,05 „	„
0,05 „	„

Die **Dosis immunisans minima** betrug also für das native Toxin **0,005 ccm.**

B. **Angesäuertes Toxin** (4,5 ccm natives Toxin + 14,9 ccm physiologische NaCl-Lösung + 0,6 ccm n-HCl; $p_H = 2,45$):

α) *Toxizität*[1]*:*

0,1 ccm	0
0,25 „	0
0,5 „	0
1,0 „	0

β) Immunisierungsvermögen:

Dosis immunisans:	Ergebnis der Reinjektion mit 0,07 ccm nativen Toxins:
0,1 ccm	†
0,25 „	†
0,5 „	†
1,0 „	Immun

C. **Regeneriertes Toxin** (10 ccm der obigen angesäuerten Lösung + 0,3 ccm n-NaOH):

α) *Toxizität:*

0,005 ccm	0
0,01 „	0
0,025 „	0
0,05 „	0
0,1 „	0
0,5 „	†
0,5 „	†

β) Immunisierungsvermögen:

0,001 ccm	†
0,005 „	†
0,01 „	†
0,025 „	Immun
0,05 „	„
0,05 „	„
0,1 „	„

---

[1]) Hier wie in allen folgenden Versuchen mit angesäuerten, regenerierten oder verdünnten Giftlösungen werden als injizierte Dosen diejenigen Mengen des *nativen Toxins* angegeben, welche rechnungsgemäß im eingespritzten Volum der betreffenden Lösung vorhanden sein mußten.

Das Resultat läßt sich daher in folgende Proportionen zusammenfassen:

Die *sicher tödlichen Dosen* der nativen, der angesäuerten und der regenerierten Toxinlösung verhielten sich wie: 0,1 ccm : ? (> 1,0 ccm) : 0,5 ccm, die Toxizitäten, d. h. die reziproken Werte, wie **200 : ? : 40.**

Die *immunisierenden Minimaldosen* verhielten sich wie 0,005 ccm : 1 ccm : 0,025 ccm, die reziproken Intensitäten der aktiv immunisierenden Wirkung wie **200 : 1 : 40.**

Die Übereinstimmung mit der Erwartung war sonach eine auffallend gute, und es ist nicht anzunehmen, daß die Interpolation von Zwischenwerten in den Titrationsreihen dieses befriedigende Ergebnis wesentlich modifiziert haben würde. Daß die saure Lösung in den geprüften Dosen überhaupt nicht tödlich wirkte, paßt sich ganz in den Rahmen des Experimentes ein; die letale Dosis hätte weit mehr als einen Kubikzentimeter (rechnungsgemäß 20 ccm) betragen müssen, Quanten, die man wegen des hohen Gehaltes an freier Säure nicht mehr in die Ohrvene der Kaninchen injizieren kann, ohne die Tiere unmittelbar zu gefährden.

Es sei jedoch ausdrücklich betont, daß Wiederholungen des hier mitgeteilten Versuches mit anderen Giftlösungen oder mit anderen Säurekonzentrationen keinen *zahlenmäßig* nachweisbaren quantitativen Parallelismus erkennen ließen, sondern daß sich die Abschwächungen bzw. Regenerationen der Toxizität und der Antigenfunktion *nur im allgemeinen* innerhalb derselben Grenzen bewegten. Insbesondere ergaben sich Differenzen bei den Auswertungen der sauren Toxine, während die regenerierten (alkalisierten) Toxine weit häufiger die nach der Theorie zu fordernden Ergebnisse lieferten. Es ist das aus mehrfachen Gründen verständlich:

1. Haften den Titrationsmethoden mehrfache Fehlerquellen an, die in den verschiedenen und teilweise zu großen Intervallen zwischen den auf Toxizität und Immunisierungsvermögen zu prüfenden Dosen der Giftlösungen liegen. Der Unterschied zwischen 0,001 und 0,005 ccm ist z. B. weit größer als der zwischen 0,025 und 0,05 ccm. Ein Ausgleich der dadurch bedingten Unregelmäßigkeiten durch feiner und gleichmäßig abgestufte Dosen hätte aber ein Tiermaterial erfordert, über welches wir zur Zeit nicht verfügen. Aus demselben Grunde war es uns auch nicht möglich, den Einfluß der individuellen Beschaffenheit der Versuchstiere (Kaninchen), der gerade beim Dysenterietoxin eine große Rolle spielt, dadurch auszuschalten, daß jede einzelne Dosis einer genügend großen Zahl von Kaninchen (nach *O'Brien* mindestens 4) eingespritzt worden wäre.

2. Erhellt aus den Untersuchungen von *C. Hallauer*, daß sich verschiedene Lösungen eines identischen, d. h. *mit demselben Stamm von*

Dysenteriebacillen hergestellten Toxins, gegen die Einwirkung von Säure bzw. gegen die nachfolgende Reaktivierung durch Alkali *verschieden* verhalten. Nach *C. Hallauer* existieren in dieser Beziehung 3 gut charakterisierbare Reaktionstypen, und zwar

a) *Bouillonkulturfiltrate von hoher primärer Toxizität*, die unter dem Einfluß eines p_H von ca. 2,5 ihre Giftigkeit zum Teil beibehalten; die Regeneration ist hier eine vollständige oder annähernd vollständige;

b) *Mittelstarke Gifte*, die im angesäuerten Zustande ihre Toxizität und ihr antigenes Vermögen anscheinend völlig verlieren; die Reaktivierung bringt beide Leistungsqualitäten wieder zum Vorschein, allerdings mit einem deutlich ausgeprägten Verlust.

c) *Schwache Gifte*, die durch Säuren unwirksam werden, die sich aber durch Alkali nicht mehr regenerieren lassen.

Es ist klar, daß sich nur Toxine vom Typus a zu Versuchen eignen werden, welche über den quantitativen Parallelismus Aufschluß bieten sollen; das verwendete Bouillonkulturfiltrat „Toxin α" gehörte in der Tat in diese Gruppe.

In Anbetracht dieser Umstände schien uns das oben wiedergegebene vielgliedrige Experiment im Vereine mit den qualitativen Prüfungen, die bereits *C. Hallauer* ausgeführt hat, genügend, um die Frage, welche der Versuchsanordnung zugrunde gelegt wurde, zu bejahen, d. h. um die Theorie von der Zugehörigkeit der toxischen und antigenen Atomgruppierungen zu einem einzigen Molekularverband und die Hypothese von der durch Säure bewirkten intramolekularen Umlagerung durch ein neues Argument zu erhärten.

II.

Für das im vorigen Abschnitt erwähnte differente Verhalten verschiedener Dysenterietoxine (Bouillonkulturfiltrate), die mit demselben Stamm Shigascher Bacillen hergestellt werden, konnte *C. Hallauer* keine Erklärung geben. Es konnte nur gezeigt werden, *daß der Toxingehalt der giftigen Filtrate bzw. das Verhältnis zwischen der im Reaktionsvolum vorhandenen Toxinmenge und dem zugesetzten Säurequantum nicht maßgebend ist*, da die Säure immer im Überschuß zur Anwendung gelangte, und da es auch nicht möglich war, den Reaktionstypus einer bestimmten Giftlösung durch Variierung der zugefügten Säuremengen in einen beliebigen anderen Typus überzuführen. Wir haben daher Toxine, welche nachweislich den 3 Reaktionstypen angehörten, miteinander verglichen, um abgesehen vom Toxingehalt noch *irgendwelche andere Eigenschaften* ausfindig zu machen, die zu dem verschiedenen Verhalten gegen Säuren in Beziehung gebracht werden könnten. Hierbei stellte sich heraus, daß die zur Gruppe a zählenden Toxine „α" und „γ" aus Bouillonkulturen (durch Filtration) gewonnen worden waren, die nach der Beimpfung

22 Tage im Thermostaten (37° C) gestanden hatten; Toxin „Toba I" (Gruppe b) stammte aus einer *11tägigen* und Toxin „Toba VIII" (Gruppe c) aus einer *5tägigen* Bouillonkultur. *Das Alter der toxischen Bouillonkultur schien sonach auf den Reaktionstypus Einfluß zu besitzen*; da mit dem Alter in der Regel auch die Giftigkeit der Kulturen bzw. der aus denselben dargestellten Filtrate zunimmt, wurde es verständlich, daß zunächst eine Abhängigkeit des Reaktionstypus vom Grade der primären Toxizität vorgetäuscht werden konnte, eine Annahme, die sich jedoch bei der experimentellen Prüfung — wie erwähnt — nicht bestätigte.

In der alternden Bouillonkultur sterben die Dysenteriebacillen ab und verfallen der Autolyse. Es gehen auf diese Weise Leibessubstanzen in Lösung, die auch in den Filtraten vorhanden sein müssen. Man könnte daher auf den Gedanken verfallen, daß diese Leibessubstanzen die Reaktion zwischen dem eigentlichen Toxin und der Säure auf irgendeine Art hemmen, oder daß sie selbst toxisch sind, aber mit der Säure anders als die in der jungen Kultur auftretenden, löslichen Gifte reagieren. Bei den Shiga-Kruseschen Bacillen hat man ja seit jeher zwischen *sezerniertem Exotoxin* und *an die Bakterienzelle gebundenem Endotoxin* unterscheiden wollen, und *Olitsky* und *Kligler* schrieben diesen beiden hypothetischen Arten des Dysenteriegiftes sogar verschiedene Wirkungen zu, dem Exotoxin eine neurotrope, dem Endotoxin eine enterotrope Affinität.

Nun wissen wir aber, daß schon ganz junge, 24stündige Agarkulturen von Shiga-Kruseschen Bacillen hochtoxisch sind, und daß große Kaninchen von 2—3 kg unter *Lähmungserscheinungen* und *schweren Darmläsionen* akut eingehen, wenn man ihnen $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ Öse einer solchen Kultur, in NaCl-Lösung suspendiert, subcutan einspritzt. Eine Vermehrung der injizierten Bakterien im Kaninchenorganismus tritt nicht ein (*Doerr*); übrigens wirkt eine (bei 56° C) abgetötete Bakteriensuspension in denselben Mengen wie die gleiche Aufschwemmung im nichtsterilisierten Zustande. Sezernierte (nach außen abgesonderte) Toxine können an dem Effekt nicht beteiligt sein, wie die Prüfung gleichaltriger Bouillonkulturen bzw. ihrer bakterienfreien Filtrate lehrt; es kommen also nur die in den Bakterienleibern selbst enthaltenen Gifte in Betracht, und diese affizieren das Nervensystem ebensowohl wie die Darmmucosa. *Doerr* hat schon in seiner ersten Publikation den Beweis erbracht, daß die Inaktivierung durch Säuren und die nachfolgende Regeneration durch Alkali nicht nur mit gelöstem Dysenteriegift (Bouillonkultur-Filtrat), sondern auch mit toxischen Bakteriensuspensionen gelingt. Bei wiederholten Nachprüfungen bekamen wir jedoch inkonstante Resultate, indem die Entgiftung durch Säure ausblieb, ohne daß wir in der Lage waren, irgendeine Ursache für das verschiedene Ver-

halten anscheinend ganz gleichartiger Suspensionen von Bacillen desselben Stammes zu ermitteln. Auf den Faktor des *Alters der Kultur* durch die Erfahrungen mit Bouillonkulturfiltraten aufmerksam gemacht, gingen wir daran, die Bedeutung dieses Momentes für die Agarkulturen zu untersuchen und fanden hier zum Teile ähnliche Verhältnisse.

A. **24stündige Agarkulturen** des Stammes „Dys. A", in NaCl-Lösung aufgeschwemmt und *sofort* zum Versuche verwendet:

1. *Toxizität der Suspension im nativen Zustande:*

0,01 ccm iv.	θ
0,025 „ „	θ
0,05 „ „	† in 8 Tagen
0,1 „ „	† „ 6 „
0,25 „ „	† „ 2 „
0,5 „ „	† „ 2 „
1,0 „ „	† „ 1 „

2. *24 ccm derselben Suspension + 6 ccm n-HCl:*

0,1 ccm iv.	θ
0,25 „ „	θ
0,5 „ „	θ
1,0 „ „	θ

3. *10 ccm der sauren Suspension + 2 ccm n-NaOH:*

0,05 ccm iv.	† in 7 Tagen
0,1 „ „	† „ 5 „
0,25 „ „	† „ 2 „
0,5 „ „	† „ 2 „
1,0 „ „	† „ 1 „

B. **5tägige Agarkulturen**, aufgeschwemmt in NaCl-Lösung; die Suspensionen bleiben **weitere 5 Tage** bei 20° C stehen und werden dann verwendet:

1. *Toxizität der nativen Suspension:*

0,01 ccm iv.	θ
0,025 „ „	θ
0,05 „ „	† in 2 Tagen
0,1 „ „	† „ 7 „
0,25 „ „	† „ 2 „

2. *24 ccm dieser Suspension + 6 ccm n-HCl:*

0,05 ccm iv.	θ
0,1 „ „	θ
0,25 „ „	Lähmungen, überlebt
0,5 „ „	† in 4 Tagen
1,0 „ „	† „ 1 „

3. *10 ccm der angesäuerten Suspension + 2 ccm n-NaOH:*

0,05 ccm iv.	θ
0,1 „ „	θ
0,25 „ „	† in 2 Tagen
0,5 „ „	† „ 2 „ .

Obwohl somit die junge Agarkultur dieselbe Toxizität besaß wie die gealterte, verlief die Inaktivierung durch Säure bei beiden in verschie-

dener Weise: *Die junge Kultur wurde vollständig entgiftet, bei der gealterten gelang die Entgiftung nur partiell.*

Worin besteht nun der Unterschied zwischen jungen und alten Kulturen einer und derselben Bakterienrasse? Im allgemeinen herrscht auch heute noch die Auffassung, daß in den alten Kulturen eine größere Anzahl abgestorbener Bakterien vorhanden ist, und daß in der die Mikrobenzellen umgebenden Nährflüssigkeit verschiedene ursprünglich fehlende Stoffe auftreten, die aus dem Zerfall der toten Bakterien stammen, daß aber die lebenden Elementarorganismen hinsichtlich ihrer Funktionen den lebenden Exemplaren in jungen Kulturen gleichgesetzt werden müssen. Würde diese Ansicht den Tatsachen entsprechen, dann müßte auch die individuelle Lebensdauer bzw. die Generationsdauer der Bakterien in der jungen wie in der alten Kultur dieselbe sein, eine Annahme, die offenbar wirklich gemacht wird, wenn man von „Bakterienpopulationen" spricht und die Geschehnisse in einem solchen Bakterienvolk mit den Vorgängen in Völkern höherer Organismen z. B. in der menschlichen Bevölkerung vergleicht, wo die Individuenzahl durch das gegenseitige Verhältnis der Vermehrungsintensität und Absterbeintensität bei gleichbleibender durchschnittlicher Lebensdauer reguliert wird. Diese Vorstellung dürfte indes kaum einer eingehenderen experimentellen Untersuchung standhalten, die wir uns vorläufig noch vorbehalten möchten. Einstweilen können wir nur auf Grund des makroskopischen Verhaltens der Agarkulturen sagen, daß in diesen die Vermehrungsvorgänge nach 24—48 Stunden ganz sistieren, da keine weitere Massenzunahme des Kulturrasens erfolgt, was unbedingt der Fall sein müßte, wenn sich bei fortschreitender Proliferation immer neue Bakterienkadaver oder Zerfallsprodukte derselben anhäufen würden; auch ist ja die Toxizität der alten Agarkultur dieselbe wie jene der jungen (in den obigen Experimenten wurden gleiche Bakterienmassen in gleichen Mengen physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt!), was vom Standpunkt einer fortschreitenden Vermehrung gleichfalls unverständlich bliebe, da sowohl lebende als auch abgetötete und autolysierte Dysenteriebacillen giftig sind. In Bouillonkulturen sind die Vorgänge natürlich weit weniger durchsichtig und weichen auch erheblich von den Vorgängen in Agarkulturen ab, da die Majorität der Bakterienzellen der ausgiebigen Einwirkung des Luft-O entzogen ist, einem für die Toxinproduktion der Dysenteriebacillen sehr wichtigen Faktor (*Doerr*, *Hirschfeld*). Hier erscheint es aber wieder auffällig, daß die Giftigkeit der Bouillonvollkulturen (d. h. der Bouillonkulturen im unfiltrierten Zustande) während der ersten Tage oder sogar Wochen, also zur Zeit der stärksten Bakterienvermehrung, so gering bleibt und erst in der gealterten Kultur, nach Sistierung der Proliferation, oft plötzlich auf das 100—1000fache ansteigt. Man dürfte kaum fehlgehen, *wenn*

man den lebenden Mikroben in der alten Kultur eine andere, und zwar eine weit höhere Lebensdauer und einen anderen Stoffwechsel zuschreibt. Die (mit dem Toxin nicht identischen!) Produkte des Stoffwechsels der Bakterien in solchen gealterten Kulturen scheinen nun die Reaktion zwischen Toxin und Säure zu modifizieren.

Das „Toxin γ" war ein Bouillonkulturfiltrat, gewonnen aus einer Bouillonkultur des Stammes „Dys. A", welche **22 Tage** im Thermostaten gestanden hatte. Das Filtrat hatte den $p_H = 8$ und besaß folgende Toxizität:

0,005 ccm iv.	θ
0,01 „ „	θ
0,025 „ „	† in 2 Tagen
0,05 „ „	† „ 2 „
0,1 „ „	† „ 2 „
0,25 „ „	† „ 1 „

1. In einer *ersten Versuchsreihe* wurde das **konzentrierte** Toxin mit n-HCl versetzt, bis der p_H auf 2,4 anstieg. Die Toxizität betrug nunmehr:

0,05 ccm iv.	θ
0,1 „ „	θ
0,25 „ „	† in 5 Tagen
0,5 „ „	† „ 4 „
1,0 „ „	† „ 3 „

Nach der Wiederherstellung eines p_H von 8 belief sich die Giftigkeit auf:

0,01 ccm iv.	θ
0,025 „ „	† in 10 Tagen
0,05 „ „	† „ 3 „
0,1 „ „	† „ 4 „
0,25 „ „	† „ 1 „

2. In der zweiten Versuchsreihe wurden 8 ccm des konzentrierten Toxins **mit 24 ccm NaCl verdünnt** und zu der Verdünnung so viel n-HCl zugesetzt, daß der $p_H = 2{,}7$ betrug; die H-Ionenkonzentration war daher noch etwas geringer als in der ersten Versuchsreihe. Die Giftigkeit der angesäuerten und der wieder neutralisierten Lösung ergab aber bei der Titration ganz andere Werte:

	Angesäuert:	Regeneriert:
0,025 ccm iv.	θ	θ
0,05 „ „	θ	† in 4 Tagen
0,1 „ „	θ	† „ 1 „
0,25 „ „	θ	† „ 2 „
0,5 „ „	θ	† „ 2 „
1,0 „ „	θ	

Am ehesten läßt sich diese Differenz erklären, wenn man annimmt, daß die in der gealterten Kultur vorhandenen und die Reaktion zwischen Säure und Toxin hemmenden Stoffe durch die Verdünnung eine Konzentrationsabnahme erfahren haben, so daß die Entgiftung in der zweiten Versuchsreihe eine vollständigere wurde, obwohl die einwirkende H-Ionenkonzentration nicht einmal so groß war wie bei dem konzentrierten Filtrat. Gewißheit ließe sich allerdings erst durch Wiederholung der Experimente mit auf verschiedenen Wegen gereinigten Toxinen und mit gewaschenen Dysenteriebacillen erzielen.

Zusammenfassung.

1. Toxizität und Antigenfunktion (aktiv immunisierende Wirkung) nehmen in quantitativ gleichem Ausmaße ab, wenn man Dysenterietoxin unter geeigneten Bedingungen mit HCl versetzt. Dieser quantitative Parallelismus tritt auch zutage, wenn man die angesäuerten Giftlösungen durch Abstumpfung der Säure (Zusatz von Alkali) wieder reaktiviert. Diese Erscheinung spricht für die Annahme, daß die chemischen Träger der beiden biologischen Wirkungsqualitäten des Dysenterietoxins Atomgruppierungen darstellen, die in einem Molekül miteinander vereinigt sind.

2. Die Reaktion zwischen Toxin und Säure verläuft je nach dem Alter der Kulturen (Bouillon- oder Agarkulturen), aus welchen das Toxin dargestellt wird, unter sonst gleichen Bedingungen verschieden. Es wird erörtert, auf welche Weise diese Differenz mit den verschiedenen Stoffwechselprozessen der Bakterien in alten und jungen Kulturen zusammenhängen könnte.

Literaturverzeichnis.

Hallauer, C., Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 138. — *Olitzki* und *Kligler*, Journ. of exp. med. 1920. — *Zangger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **101**, 39. — *Zdansky* und *B. M. Herzog*, Ebenda **102**, 352. — *Doerr*, Rapports sur les recherches sérologiques. Société des Nations 1923.

(Aus dem Mikrobiologischen Laboratorium des Bezirksgesundheitsamtes in Odessa, Ukraine. — Vorstand: Prof. Dr. *J. Bardach*.)

Zur Mikrobiologie des Bodens der Rieselfelder.

I. Mitteilung.

Von
L. Rubentschik, Odessa.

Vom mikrobiologischen Standpunkt aus stellt der Boden der Rieselfelder ein sehr interessantes Medium dar. Die spezifischen physikalisch-chemischen Bedingungen im Boden der Rieselfelder müssen natürlich einen bestimmten Einfluß auf den Bestand und die Tätigkeit der ihn besiedelnden Mikroorganismen ausüben. Die Mineralisationsgeschwindigkeit großer Mengen von organischen Verbindungen, die alltäglich auf die Rieselfelder gelangen, weist darauf hin, daß dieser Boden von sehr aktiven Mikroben bewohnt ist, unter deren Mitwirkung einzelne Etappen der Selbstreinigung der Abwässer sich schnell abspielen. Aus welchen Arten aber die bakterielle Bevölkerung des Bodens der Rieselfelder besteht, und wie dort ihr Leben verläuft — davon wissen wir noch ganz wenig. Allerdings ist es bekannt, daß auf den Rieselfeldern Fäulnis-, Denitrifikations-, Harnstoffzersetzungs-, Cellulosegärungs- u. a. Prozesse stattfinden. Aber welche Mikroben an jedem der eben genannten Prozesse teilnehmen, ob diese oder jene Art eine beständige und überall verbreitete ist, wie groß die Energie der einzelnen biochemischen Prozesse in jedem konkreten Fall ist, ob diese Energie von der Qualität oder der Quantität der an diesem Prozesse teilnehmenden Mikroben abhängt, wie verschiedene äußere Faktoren auf den Bestand und die Tätigkeit der Mikroben wirken — diese Fragen sind in bezug auf die Böden der Rieselfelder gar oder fast nicht untersucht. Überhaupt teilt man dem Boden bei der mikrobiologischen Erforschung der Rieselfelder keine oder eine ganz unbedeutende Rolle zu. Hauptsächlich wird gewöhnlich die Aufmerksamkeit den vergleichenden Untersuchungen der Kloaken- und Drainwässer gewidmet. Solche Untersuchungen sind in der Tat von

großer Wichtigkeit, weil sie über die aktuelle Arbeit der Rieselfelder zu urteilen gestatten. Aber nur dann wird es möglich sein, von der bloßen Konstatierung eines bestimmten Zustandes der Rieselfelder zur Erklärung dieses Zustandes überzugehen, wenn der Boden der Rieselfelder genau und allseitig untersucht werden wird, weil gerade dort die Zersetzung hochmolekularer Verbindungen stattfindet.

Es muß aber betont werden, daß der mikrobiologische Teil solcher Forschungen jetzt noch auf eine Reihe nicht überwundener methodischer Schwierigkeiten stößt. Die gegenwärtige Bodenmikrobiologie befindet sich überhaupt in einer Periode der Überschätzung vieler von ihr erhaltener Resultate. Sie sucht neue Bahnen, um das Leben der Mikroben im Boden näher und richtiger studieren zu können. Bekanntlich bestanden ursprünglich die bodenmikrobiologischen Analysen nur in dem Zählen und der Artbestimmung der Mikroben, die auf gewöhnlichen festen Nährmedien (Fleisch-Pepton-Gelatine oder Fleisch-Pepton-Agar) in Petri-Schalen wuchsen. Das war die Epoche des übermäßigen Vertrauens zu der Methode *Kochs*, die man für eine universale hielt. Nachdem aber festgestellt worden war, daß eine Reihe wichtigster Mikroben (nitrifizierende, stickstoffbindende, cellulosezersetzende u. a.) auf den obengenannten Nährmedien nicht gedeihen, wurde die Unvollständigkeit eines solchen Studiums des Bodens klar. Dann schlugen *Hiltner* und *Störmer*[1]) eine neue Methode vor, dank der man die Zahl einiger auf gewöhnlichen Medien nicht wachsender Bodenbakterien bestimmen kann, indem man flüssige elektive Kulturen anwendet. Jedoch wurden auch gegen diese Methode Einsprüche gemacht. Wie die Untersuchungen *Marchals*[2]) über Fäulnisbakterien und die von *Löhnis*[3]) über harnstoffzersetzende Bakterien zeigten, kann die Energie verschiedener Rassen einer Bakterienart in sehr großen Grenzen schwanken. Wenn selbst also eine genaue Bestimmung der Bakterienzahl nach *Hiltner* und *Störmer* möglich wäre, so könnten solche Resultate noch nichts über die Tätigkeit dieser Bakterien im Boden sagen. Daher begann *Remy*[4]) als erster die bakterielle Kraft des Bodens zu bestimmen, d. h. die Energie der in dem zu untersuchenden Boden vorhandenen nitrifizierenden, denitrifizierenden, harnstoffzersetzenden und stickstoffassimilierenden Mikroben in bestimmten Zahlgrößen auszudrücken. Jedoch die Methode *Remys* sowie auch ihre weiteren Modifikationen führen dazu, daß die zu untersuchenden bakteriellen Prozesse sich im Laboratorium unter ganz anderen äußeren Bedingungen als in der Natur abspielen. Daher können die auf solche Weise erhaltenen Ergebnisse nicht immer richtig die wahre Größe der von Bodenbakterien in natürlichen Bedingungen ihrer Vegetation produzierten Arbeit bestimmen. Andererseits haben solche Untersuchungen

einen beschränkten Charakter, da sie die Frage des Artbestandes und der Zahl der Mikroben im gegebenen Boden unerklärt lassen. *Hugo Fischer*[5]) schlug vor, die Prinzipien der botanisch-ökologischen Forschungen bei der Bodenmikrobiologie anzuwenden. Jedoch in bezug auf Rieselfelder, bei dem ungeheuren Reichtum und Mannigfaltigkeit ihrer Mikrobenbevölkerung wären solche Untersuchungen sehr lästig und zeitraubend, und dessenungeachtet könnten sie eine Gewißheit nicht geben, daß die Extrapolierung der Laboratorienergebnisse ganz zuverlässig wäre.

Wie man aus dem Gesagten sieht, ist die gegenwärtige Bodenmikrobiologie von einem klaren Begriff der Biodynamik des Bodens noch weit entfernt. Diese Unvollständigkeit der vorhandenen mikrobiologischen Methoden der Bodenuntersuchung, die übrigens alle Forscher zugestehen, wurde 1922 in besonders scharfer Form von *H. Pringheim*[6]) charakterisiert: „Jetzt leben wir in einer solchen Periode der Bodenbakteriologie, von der wohl niemand mehr große Erfolge oder gar nutzbringende praktische Resultate erwartet.“ In den letzteren Jahren erschien auf dem Gebiete der Bodenmikrobiologie eine Reihe interessanter Untersuchungen amerikanischer Autoren (*Lipman*, *Waksman* u. a.). Aber besonders bemerkenswert sind die kürzlich veröffentlichten Arbeiten *Winogradskys*[7]), die bahnbrechend zu werden und neue Horizonte im mikrobiologischen Studium des Bodens zu öffnen versprechen. In diesen Arbeiten bestrebt sich *Winogradsky*, den Abgrund zu vernichten, der bisher zwischen den Bedingungen des Bakterienlebens im Boden und ihrer Reproduktion im Laboratorium existierte. Dazu untersucht er die Bodenmikroflora unmittelbar im Boden, den er nach der Methode *Conns* mit sauren Farben (Erythrosin extra) färbt. Auf diese Weise werden Präparate erhalten, die ein reelles Bild der Mikrobenbevölkerung der gegebenen Bodenprobe zeigen. Da frischgedüngter Boden ungeheuer reich an Mikroben ist, so geht *Winogradsky* vom normalen Boden aus, der lang keine Düngung bekam (terre témoin). Dort bleiben nach der Zersetzung sich leicht oxydierender Verbindungen nur wenige Mikroben übrig, die langsame Humifikationsprozesse erzeugen. *Winogradsky* vereinigt sie in eine gemeinsame Gruppe „autochthone Mikroben“. Abgesehen von der Statik, geht er auch zum Studium der Bodendynamik über. Diese vielversprechenden Untersuchungen sind aber jetzt noch im Anfangsstadium ihrer Entwicklung und beziehen sich, wie es schon oben betont war, hauptsächlich auf Böden, die zu einem standhaften biologischen Zustand gekommen sind.

Im allgemeinen kann man auf Grund des oben angegebenen kurzen Überblickes des gegenwärtigen Zustandes der Bodenmikrobiologie zum Schlusse kommen, daß ein allseitiges Studium des Mikrobenlebens im

Boden der Rieselfelder noch nicht erreichbar ist. Deshalb ist es möglich, sich nur mit einigen Fragen der Mikrobiologie dieses Mediums zu beschäftigen.

Die unten angeführten Untersuchungen des Bodens des Odessaer Rieselfeldes fanden 1923/24 statt. Der Boden dieses Rieselfeldes besteht aus Quarzsand mit reichem Muschelgehalt. Die zu analysierenden Bodenproben wurden aus etwa 8 cm Tiefe genommen.

I. Untersuchungen über Mischkulturen.

Zur Isolierung der Bodenbakterien verwandte man früher (zum Teil auch noch jetzt) Fleisch-Pepton-Gelatine oder Fleisch-Pepton-Agar. Diese Nährsubstrate sind aber dazu nicht ganz tauglich. Einige Bakterien, z. B. der im Boden immer vorhandene Bac. dendroides, bilden in Petri-Schalen Kolonien, die sich weit über die Oberfläche dieser Nährmedien verbreiten. Daher wird die Entwicklung anderer, langsam wachsender Bakterienarten unterdrückt. Aus diesem sowie auch aus anderen Gründen schlugen verschiedene Autoren andere Medien vor, die zur mikrobiologischen Bodenuntersuchung verwendbarer sind. Von einer großen Zahl solcher Nährmedien wurden von uns folgende probiert:

Medium *Arthur Meyers*[8]): (Agar 1,25%; Dextrose 0,1%; weinsaures Ammonium 0,1%; KNO_3 0,05%; Soda 0,15%; K_2HPO_4 0,1%; $CaCl_2$ 0,01%; $MgSO_4$ 0,03%; NaCl 0,01%; Fe_2Cl_6 0,001%).

Medium *Lipmans* und *Browns*[9]): (1000 ccm Leitungswasser; 10 g Dextrose; 1,5 g K_2HPO_4; 0,2 g $MgSO_4$; 0,05 g Pepton; 20 g Agar).

Medium *Störmers*[10]): (Bodenextrakt + 0,2% K_2HPO_4 + 2% Agar).

Medium *Hugo Fischers*[8]): (Dieselbe Zusammensetzung wie im Medium *Störmers*, nur der Boden mit 0,1 proz. Sodalösung extrahiert).

Medium *Tharntons*[11]): (Asparagin 0,05‰; Mannit 1‰; KNO_3 0,5‰; Agar 1,5%; K_2HPO_4 1‰; $MgSO_4$ 0,2‰; $CaCl_2$ 0,01‰; NaCl 0,01%; $FeCl_3$ 0,0002%).

Da die Mikroben der Rieselfelder an einen erhöhten Inhalt von organischen Verbindungen gewöhnt sind, versuchten wir auch eine Zugabe von 0,5% Pepton zu *Hugo Fischers* Medium. Die Reaktion aller obengenannter Nährböden sowie auch des Fleisch-Pepton-Agars wurde durch entsprechende Mengen von Soda ausgeglichen: 1 L. eines beliebigen von diesen Substraten forderte zu seiner Neutralisation je 100 ccm 0,1 norm. HCl.

Diese Medien, je in 8 Exemplaren, wurden mit gleicher Bodenquantität (0,0001 g) geimpft. Das Zählen der Kolonien, die in Petri-Schalen bei 20—24° aufwuchsen, fand am 7. Tage statt.

In Tab. 1 sind die Resultate der Zählung der Bakterien auf den obengezeigten Medien angeführt.

Tabelle 1. *Zahl der Bakterien in 0,0001 g Boden.*

Parallele	Nährmedien			
	Lipmans und Browns	Arthur Meyers	Störmers	Hugo Fischers
1	820	700	730	890
2	880	686	670	930
3	834	624	690	820
4	900	720	770	970
5	828	680	684	840
6	845	616	628	902
7	901	702	670	939
8	810	640	710	885
	$M \pm m = 852 \pm 15{,}3$	$M \pm m = 671 \pm 14$	$M \pm m = 690 \pm 32{,}1$	$M \pm m = 897 \pm 18$

Parallele	Nährmedien		
	Hugo Fischers + 0,5% Pepton	Tharntons	Fleisch-Pepton-Agar
1	1099	720	660
2	1134	810	670
3	1101	740	715
4	1062	760	740
5	1091	792	680
6	1106	730	730
7	1041	802	630
8	1070	769	700
	$M \pm m = 1088 \pm 26{,}8$	$M \pm m = 756 \pm 44{,}2$	$M \pm m = 692 \pm 12{,}4$

Die mittleren Fehler der Mittelwerte wurden nach der Formel[12])

$$m = \pm \sqrt{\frac{\Sigma V^2}{n} - M^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n-1}}$$

berechnet, wo m der mittlere Fehler, M der Mittelwert, n die Zahl aller Varianten und ΣV^2 die Summe der Quadrate aller Varianten bezeichnen.

Bekanntlich können 2 Mittelwerte nur dann zu verschiedenen Variationsreihen gerechnet werden, wenn die Differenz zwischen diesen Mittelwerten die verdreifachte Differenz zwischen ihren mittleren Fehlern überschreitet. Diesem Anspruch gemäß ist die Differenz zwischen der Zahl der Bakterien, z. B. auf dem Medium *Hugo Fischers* und der auf dem Medium *Lipmans* und *Browns* nicht genügend, um über einen Vorzug des einen vor dem anderen sprechen zu können. Dafür gibt aber das Medium *Hugo Fischers* + 0,5% Pepton unleugbar die besten Resultate, weil

$$M_1 - M_2 \pm \sqrt{m_1^2 + m_2^2} = 1088 - 897 \pm \sqrt{26{,}8^2 + 18^2} = 191 \pm 32{,}2; 5{,}9:1.$$

Der Vorzug des letzteren Mediums äußerte sich nicht nur in der größten absoluten Zahl der auf diesem Medium ausgewachsenen Kolo-

nien, sondern auch in folgendem: 1. Die Zahl verschiedener Bakterienarten überschritt die auf den anderen Nährböden; 2. die sich über die Oberfläche verbreitenden Kolonien fehlten.

Da die Reaktion der Nährmedien willkürlich ausgewählt und nur in bezug auf die Gesamtquantität der Säuren und Basen ausgeglichen wurde, so sind weitere Untersuchungen in dieser Richtung erforderlich.

Das Bakterienzählen auf dem Medium *Hugo Fischers* mit 0,5% Pepton zeigte, daß 1 g lufttrockner Boden enthielt:

Parzelle Nr. 9	12 160 000—15 720 000	Bakterien
Parzelle Nr. 10	9 400 000—10 870 000	„
Parzelle Nr. 13	13 670 000—16 100 000	„
Parzellen Nr. 75—76	12 070 000—14 920 000	„

Außer der „Gesamtzahl" der Bakterien wurde auch die Menge der im Boden des Rieselfeldes vorhandenen nitrifizierenden, denitrifizierenden, harnstoffzersetzenden und Fäulnisbakterien bestimmt. Die Resultate dieser Analysen, die nach der Methode *Hiltners* und *Störmers* ausgeführt wurden, sind aus Tab. 2 ersichtlich.

Tabelle 2.
Zahl der Bakterien in 1 g lufttrockenem Boden. Parzelle Nr. 75—76.

Bakterien	Juli 1923	Februar 1924	Verhältnisse
Fäulnis-	7 000 000	4 000 000	1,75 : 1
nitrifizierende	9 000	4 000	2,25 : 1
denitrifizierende	200 000	100 000	2 : 1
harnstoffzersetzende	70 000	60 000	1,17 : 1

Auf diese Weise (Tab. 2) enthielten die im Juli genommenen Bodenproben mehr Bakterien als die vom Februar. Die maximale Differenz wurde in der Gruppe der nitrifizierenden Bakterien beobachtet, wo das Verhältnis der Zahl der Bakterien im Juli zu der im Februar = 2,25: 1 war.

Zur Bestimmung der bakteriellen Kraft des Bodens des Odessaer Rieselfeldes verwandten wir die Methode *Remys*. Der Fäulnisprozeß ging in 5 Probiergläsern, je mit 10 ccm 1 proz. Peptonwasser, vor sich. Nach 5 Tagen wurde das gebildete Ammoniak mittels Magnesia usta abdestilliert und in 0,1 norm. H_2SO_4 aufgefangen. Die Nitrifikation verlief in Omelianski-Lösung, die nur 1‰ $(NH_4)_2SO_4$ (13) enthielt; zu je 50 ccm unter Zusatz von Kreide in 200 ccm-Erlenmeyer-Kolben. Die nach 30 Tagen gebildete Salpetersäure wurde, nachdem das noch nicht oxydierte Ammoniak mittels Natronlauge verdrängt wurde, durch 24stündige Einwirkung von Natronlauge, Zink und Eisen reduziert, danach ebenfalls als Ammoniak abdestilliert und in eine 0,1 norm. H_2SO_4 aufgefangen. Die Harnstoffzersetzung verlief in 10%-Harnstoffbouillon nach *Beijerinck* zu je 10 ccm in Probiergläsern. Das

nach 5 Tagen gebildete NH_3 wurde mit 0,1 norm. H_2SO_4 titriert. Alle Kulturen wurden mit 10 proz. Boden geimpft. Die Temperatur während der Untersuchungen schwankte zwischen 20—24°.

Aus Tab. 3 ist ersichtlich, daß in den im Juli genommenen Bodenproben die obengenannten bakteriellen Prozesse energischer verliefen als in denen vom Februar. Besonders groß zeigte sich der Unterschied in der harnstoffzersetzenden Kraft des Bodens, die im Juli 2,04 mal höher als im Februar war.

Tabelle 3.

Zeit	Fäulnis			Nitrifikation			Harnstoffgärung		
	Menge des nach 5 Tagen gebildeten NH_3-Stickstoffs (in mg)		Verhältnisse	Menge des nach 80 Tg. gebildeten N_2O_5-Stickstoffs (in mg)		Verhältnisse	Menge des nach 5 Tagen gebildeten NH_3-Stickstoffs (in mg)		Verhältnisse
Juli 1923	8,54	8,4	1,24 : 1	9,18	8,82	1,14 : 1	391	392	2,04 : 1
	8,16			8,73			379		
	8,24			8,45			405		
	8,43			9,05			395		
	8,63			8,70			390		
Februar 1924	7,00	6,76		7,75	7,72		192	192	
	6,65			7,80			188		
	6,85			7,60			200		
	6,54			7,85			186		
	6,76			7,60			194		

Wenn man jetzt die Angaben über die Zahl der Bakterien (Tab. 2) mit denen über die Intensivität der von diesen Bakterien hervorgerufenen Prozesse (Tab. 3) zusammenstellt, so kann man konstatieren, daß zwischen ihnen ein Parallelismus stattfindet: im Juli, als die Zahlen der Bakterien größer als im Februar waren, stieg auch das entsprechende Umsetzungsvermögen des Bodens (Tab. 4). Aber in diesem Parallelismus war keine Proportionalität vorhanden. So verhielt sich z. B. die Zahl der nitrifizierenden Bakterien im Juli zu der im Februar wie 2,25: 1, während das Verhältnis der nitrifizierenden Bodenkraft in diesen Monaten = 1,14: 1 war. In der Gruppe aber der harnstoffspaltenden Bakterien stieg umgekehrt das Umsetzungsvermögen mehr (2,04:1) als die Zahl der Bakterien (1,17: 1). (Tab. 4.)

Tabelle 4.

Bakterien	Verhältnisse	
	zwischen den im Juli und im Februar erhaltenen Zahlen der Bakterien	zwischen dem Umsetzungsvermögen der Bakterien im Juli und im Februar
nitrifizierende	2,25 : 1	1,14 : 1
harnstoffzersetzende	1,17 : 1	2,04 : 1
Fäulnis-	1,75 : 1	1,24 : 1

Die in der Literatur vorhandenen Angaben (über die Acker- oder Gartenböden) weisen auch auf das Nichtvorhandensein der Proportionalität zwischen den obengenannten Größen hin. In einigen Fällen aber wurde sogar kein Parallelismus beobachtet, so daß eine Vergrößerung der Zahl der Bakterien bei einer Verminderung ihrer Umsetzungsarbeit stattfand (14, 15, 16).

II. Untersuchungen über Reinkulturen.

Außer der oben angeführten Untersuchungen über die Zahl und die Arbeit der Bakterien des Bodens des Odessaer Rieselfeldes wurden von uns einige Vertreter der biologisch wichtigsten Bakteriengruppen ausgesondert und in Reinkulturen studiert.

Zur Isolierung des Erregers des 1. Stadiums der Nitrifikation verwandten wir, nachdem die vorherige Anhäufung dieser Bakterie in üblicher Weise gemacht worden war, die festen Medien *Omelianskis* (Magnesiagipsplatten und Papierscheiben)[17]. Bekanntlich sind 2 Genera dieser Bakterie vorhanden, Nitrosomonas und Nitrosococcus, von denen jede mehrere Arten oder Abarten hat[18]. Der von uns in Reinkultur isolierte Stamm hatte das Aussehen eines ovalen Stäbchens von 1,0—1,2 μ Länge und 0,85—0,95 μ Breite. Die in der Literatur beschriebenen Nitritbildner sind von verschiedener Größe. So isolierte z. B. *Rubel*[19]) aus den Petersburger biologischen Filtern eine sehr kleine Abart dieser Bakterie, die eine Länge von nur 0,6 μ erreichte. Annähernd derselben Größe war Nitrosomonas javanensis Wing. Der Nitrosomonas aus der Petersburger Erde ist ganz kokkenähnlich und hat einen Diameter von 1 μ[20]). In dem Züricher Boden sowie auf den Rieselfeldern Gennevilliers (bei Paris) erreicht die Länge des Nitrosomonas 1,2—1,8 μ, seine Breite aber 0,9—1,0 μ. *Makrinoff*[21]) isolierte aus dem Moskauer Boden und aus dem Salzboden des Samara-Gouvernements einen Nitritbildner von 1,8 μ Länge und 1,3 μ Breite. Auf diese Weise hat die Nitrosomonas-Art des Odessaer Rieselfeldes eine mittlere Größe. Diese Art färbt sich gut und gleichmäßig mit gewöhnlichen Anilinfarben. Das bei einigen Nitrosomonas-Arten beschriebene zentral liegende Körnchen[20]) wurde bei ihr nicht beobachtet. Wie bei der Nitritbakterie aus den Rieselfeldern Gennevilliers sind bei der von uns isolierten Rasse 2 Entwicklungszustände vorhanden: Zooglöen- und Monadenform. Bei reichlichem NH_3-Gehalt befinden sich die Bakterien auf dem Boden der Erlenmeyer-Kolben in dem Niederschlag von Calcium- oder Magnesiumcarbonat. Dort bilden sie Zooglöen, die zuweilen ziemlich kompakt und scharf umgrenzt sind. Zum Ende aber der Nitrifikation, wenn nur wenig NH_3 übrigbleibt, erscheinen bewegliche Zellen. Die Energie dieser Rasse erwies sich als nicht groß: eine Oxydation von $2^0/_{00}$ $(NH_4)_2SO_4$ findet gewöhnlich erst nach 29—35 Tagen (bei 20—24° C) statt.

Die sich bei der Nitrifikation bildenden Nitrate haben eine wichtige Bedeutung, da sie als Indicator des Reinigungsgrads der Kloakenwässer dienen können. Andererseits spielen sie eine hervorragende Rolle in dem Haushalte der Rieselfelder, weil die Bodenfruchtbarkeit der letzteren von diesen Verbindungen abhängt. Daher war es von Interesse, sich auch mit jenen Bakterien zu befassen, die eine Zersetzung der Nitrate hervorrufen können. Bekanntlich versteht man unter der Denitrifikation im weiteren Sinne des Wortes eine Nitratreduktion, unabhängig davon, wieweit diese Reduktion von sich geht. Im engeren Sinne des Wortes aber ist die Denitrifikation ein tiefer Zersetzungsprozeß der Nitrate, die bis N_2O, NO oder sogar N reduziert werden. Zur Isolierung und zum Studium der denitrifizierenden Bakterien verwandten wir das nach *Hugo Fischer*[22]) modifizierte Nährmedium *Giltays*. Hier zersetzten mehrere aus dem Boden des Rieselfeldes ausgesonderte Bakterienarten Nitrate nur bis zu den Nitriten. Was aber die echten denitrifizierenden Bakterien mit einer tiefen nitratreduzierenden Fähigkeit anbelangt, so haben wir Bac. pyocyaneus Gessard, Bac. denitrificans agilis Ampola und Garino und einige Abarten des Bac. fluorescens liquefaciens Flügge und non liquefaciens Pansini isoliert.

Wenn die Arbeit der denitrifizierenden Bakterien zu einer Verminderung der Stickstoffquantität des Bodens führt, so sind daneben auch solche Bakterien vorhanden, die nur eine Demobilisation des Stickstoffs im Boden hervorrufen, indem sie Nitrate in organische, von Pflanzen nicht assimilierbare Verbindungen verwandeln. Solche Bakterien bezeichneten *Gerlach* und *Vogel*[23]) als „eiweißbildende" Bakterien. Da aber nicht ohne weiteres anzunehmen ist, daß wirklich nur Eiweiß dabei entsteht, so nannte *Löhnis*[24]) diese Bakterien „salpeterassimilierende". Zu ihrer Anhäufung verwandte er Bodenextrakt + 1% Glycerin + 0,1% $NaNO_3$ + 0,05% K_2HPO_4. Indem wir dieses Medium mit dem Boden des Rieselfeldes impften, beobachteten wir manchmal anstatt „Salpeterassimilation" eine echte Denitrifikation. Dasselbe fand auch bei weiteren Überimpfungen in diesem Medium statt. Nur in einigen Fällen verschwanden die Nitrate ohne NH_3-, N_2O_3- und Gasbildung. Um eine bessere Anhäufung der „salpeterassimilierenden" Bakterien zu erreichen, versuchten wir Glycerin durch andere Kohlenstoffquellen in dem obengezeigten Medium von *Löhnis* zu ersetzen. Aber die ausgeführten Versuche mit citronensaurem Na, milchsaurem Na, apfelsaurem Na, bernsteinsaurem Na, oxalsaurem Na, Mannit, Dextrin, Asparagin, Dextrose und Saccharose (je 1%) gaben noch schlechtere Resultate als die mit Glycerin. Im Medium mit citronensaurem Na wurde zuweilen eine sehr üppige Entwicklung des Bac. fluorescens liquefaciens Flügge beobachtet, so daß die Flüssigkeit eine intensive grüne Farbe bekam. Jedoch in Reinkultur erwies sich diese Art als eine

echte denitrifizierende Bakterie. Die Fähigkeit aber, Salpeterstickstoff in organischen Verbindungen zu verwandeln, wurde von uns bei 2 noch nicht bestimmten Bakterienarten, N 1 und N 2, beobachtet. Es sind also im Boden des Odessaer Rieselfeldes solche Bakterien vorhanden, die als Konkurrenten der höheren Pflanzen bei Nitratassimilation hervortreten können.

Die Odessaer Kloakenwässer bringen alltäglich eine beträchtliche Menge Harnstoff zu dem Rieselfeld. Daher verdienten die Aufmerksamkeit auch jene Bakterien, die den Harnstoff in Ammoncarbonat (resp. NH_3 und CO_2) zersetzen. Zur Anhäufung solcher Bakterien wurde von uns das Medium *Beijerincks*[25]) verwendet. Nachdem in diesem Medium die Gärung anfing, wurden täglich Überimpfungen auf Fleischwasseragar mit 2% Harnstoff gemacht. Auf diese Weise gelang es uns folgende Bakterien in Reinkultur zu isolieren: Urococcus ureae Cohn, Urobac. Miquelii Beijer., Urobac. Pasteurii Miquel und mehrere harnstoffzersetzende fluorescierende Arten.

Weitere Untersuchungen der Bodenmikroflora des Odessaer Rieselfeldes sind im Gange.

Herrn Prof. Dr. *J. J. Bardach* spreche ich für sein freundliches Entgegenkommen meinen herzlichen Dank aus.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Hiltner, L.* und *Störmer*, Arb. a. d. biol. Abt. d. Kais. Gesundheitsamtes **3**, 474. 1903. — [2]) *Marchall, E.*, Bull. de l'Acad. de Belgique **3**, 25, 738. 1893. — [3]) *Löhnis, F.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionkrankh., Abt. 2, **14**, 398—717—720. 1905. — [4]) *Remy, Th.*, Ibid., Abt. 2, **8**, 657. 1902. — [5]) *Fischer, Hugo*, Ibid., Abt. 2, **23**, 146. 1909. — [6]) *Pringsheim, H.*, Med. Klinik 1922, Nr. 43. — [7]) *Winogradsky, S.*, Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **178**, 1236. 1924; **179**, 364 u. 868. 1924; Ann. de l'inst. Pasteur **39**, 299. 1925. — [8]) *Fischer, Hugo*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, **25**, 457. 1910. — [9]) *Lipman, J. G.* und *Brown*, Ann. Rep. New Jersey Agric. Exp. Stat. **29**, 95. 1904. — [10]) *Störmer, K.*, Jahresber. d. Ver. f. angew. Botan. **5**, 123. 1907. — [11]) *Tharnton*, Ann. of applied Biologie **9**, 241. 1922. — [12]) *Sapegin, A.*, Varjatzionaja statistika (russisch), 2. Aufl., 1922. — [13]) *Löhnis, F.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, **12**, 455. 1904. — [14]) *Löhnis, F.*, Ibid., Abt. 2, **14**, 6. 1905. — [15]) *Engberding, D.*, Ibid., Abt. 2, **23**, 235. 1909. — [16]) *Maasen* und *Behn*, Arb. a. d. biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwiss. **11**, 309. 1923. — [17]) *Omelianski, W.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, **5**, 652. 1899; **8**, 785. 1902. — [18]) Archives des sciences biologiques publiées à St-Pétersbourg **1**, 87. 1892. — [19]) *Rubel, M. N.*, K charakterist. Mikrobof nitrifikazii biol. filtrof. (russisch). Inaug.-Diss. Petersburg 1913. — [20]) *Winogradsky, S.*, Lafars Handbuch d. Texn. Mykol. **3**, 160. 1904—1906. — [21]) *Makrinoff, J.*, Vest. bakter.-agron. Stanzii imeni K. F. Ferreina, 1908, Nr. 14, S. 160 (russisch). — [22]) *Fischer, Hvgo*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, **20**, 256. 1908. — [23]) *Gerlach* und *Vogel*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, **7**, 609. 1901. — [24]) *Löhnis, F.*, Ibid., Abt. 2, **14**, 598. 1905. — [25]) *Beijerinck, M. W.*, Ibid., Abt. 2, **7**, 33. 1901.

(Aus der Seuchenabteilung des Instituts „Robert Koch“.
Abteilungsleiter: Prof. *B. Lange*.)

Experimentelle Infektionen von Mäusen und Meerschweinchen parenteral und von den natürlichen Eingangspforten aus.

II. Mitteilung.

Parenterale Infektion von Mäusen mit Milzbranderregern.

Von
Dr. Yoshiho Uchida, Kanazawa (Japan).

Vergleichende quantitative Untersuchungen über die Empfänglichkeit der Haut, des Blutgefäßsystems und der Bauchhöhle gegenüber parenteraler Verimpfung von Milzbranderregern sind an Mäusen, soviel ich sehe, nur von *Sobernheim* und *Murata* angestellt worden. *Sobernheim* und *Murata*, die kurz über ihre Resultate berichten, fanden gegenüber zwanzigstündiger Milzbrandorgankultur die Empfänglichkeit der Haut (d. h. des Subcutangewebes) höher als die des Blutgefäßsystems.

Gelegentlich meiner früher mitgeteilten Untersuchungen über die *natürliche* Milzbrandinfektion der Maus (1. Mitteilung) habe ich zur Virulenzbestimmung meiner Kulturen Mäuse intraperitoneal und subcutan infiziert. Dabei machte ich die Beobachtung, daß bei der Maus in gewisser Hinsicht *die Bauchhöhle für die Infektion höher empfänglich ist als die Haut.* Zwar waren in der Regel von der Haut kleinere Keimmengen wirksamer als von der Bauchhöhle aus, aber bei Infektion mit gleichen Mengen von Sporen und Bacillen starben die ip.-geimpften Tiere schneller als die subcutan geimpften. Bei der Sektion fand sich bei den Peritonealtieren eine Peritonitis von einem Grade, wie ich sie nach Hautinfektion niemals beobachtet habe. Ich habe deshalb aus diesen Versuchen den Eindruck gewonnen, daß bei der Maus in bezug auf die Empfänglichkeit der Organe gegen Milzbrand *grundsätzlich andere Verhältnisse vorliegen, als sie von einer Reihe von Autoren* (*Machnoff*, *Galtier*, *Noetzel*, *van Leent* u. a.)[1]) *für Meerschweinchen, Kaninchen und größere Versuchstiere festgestellt worden sind.* Diesen Autoren ist immer wieder die hohe Empfänglichkeit des Hautorgans im besonderen auch verglichen mit der Bauchhöhle und dem Blutgefäßsystem bei parenteraler Infektion aufgefallen, neuerdings ist von *Besredka* auf Grund von Versuchen an Meerschweinchen sogar die Haut als das einzige milzbrandempfängliche Organ bezeichnet worden.

---

[1]) Literatur bei Sobernheim, Handbuch der pathogen. Mikroorg. Bd. III, Jena 1913.

Auf die Nachprüfung der Besredkaschen Experimente durch eine Reihe anderer Autoren werde ich bei Besprechung meiner Milzbrandversuche an Meerschweinchen (III. Mitteilung) näher eingehen. Hier nur soviel, daß die Annahme einer ausschließlichen Empfänglichkeit der Haut von mehreren Forschern einwandfrei widerlegt worden ist, daß aber andererseits doch in fast allen einschlägigen Experimenten die *elektive Empfänglichkeit des Hautorgans für die Milzbrandinfektion* verglichen mit der Bauchhöhle und dem Blutgefäßsystem deutlich hervorgetreten ist.

Mit Rücksicht auf diesen Sachverhalt und auf die Ergebnisse meiner Untersuchungen betreffend *die natürliche Milzbrandinfektion der Maus* schien eine Bestätigung und Ergänzung meiner oben erwähnten Beobachtungen über die *parenterale* Milzbrandinfektion weißer Mäuse von Interesse.

Die Ergebnisse der nach dieser Richtung hin angestellten Versuche seien im folgenden mitgeteilt[1]).

Zunächst einige Bemerkungen über die Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden sämtlich mit einem für Meerschweinchen und Mäuse hochvirulenten Milzbrandstamm (Km) ausgeführt, und zwar teils mit Kulturen, teils mit bacillenhaltigen Organaufschwemmungen von an Milzbrand verendeten Mäusen und Meerschweinchen. Um in einigen Versuchen stark versporte Bacillen zu bekommen, wurden Milzbrandagarkulturen mehrere Tage bei 37°, dann evtl. noch bei Zimmertemperatur gehalten. Zur Ermittlung der kleinsten in künstlicher Kultur noch eben entwicklungsfähigen Bakterienmenge wurde Kulturmaterial oder Organe in Bouillon aufgeschwemmt (von Kultur 1 Öse pro 1 ccm) und Verdünnungen 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 usw. in Bouillon angelegt, in einigen Versuchen mit Verdünnung des Ausgangsmaterials 1 : 100 000 mehrere Agarplatten gegossen. Es erwies sich die Plattenmethode dabei übrigens als gleichwertig der Verdünnungsmethode in flüssiger Kultur. Falls eine gute Verteilung der Bacillen in der Suspensionsflüssigkeit beim Verreiben nicht glückte, wurde die Bacillenaufschwemmung mit Glasperlen im Schüttelapparat 30 Min. geschüttelt.

Die gleiche Bakterienmenge, welche in ein Bouillonröhrchen verbracht und dann einige Tage bei 37° bebrütet wurde, verimpfte ich in einer Flüssigkeitsmenge von 0,2 ccm subcutan, intravenös und intraperitoneal auf je 1 Maus (von in der Regel 2 Mäusen für jede Infektionsart). Gewöhnlich wurden Verdünnungen von $^{1}/_{100\,000}$ bis $^{1}/_{1\,000\,000\,000}$ des Ausgangsmaterials in dieser Weise in vitro und in vivo vergleichend geprüft.

Die subcutane Impfung geschah in die Rückenhaut, dicht oberhalb der Schwanzwurzel. Bei der intravenösen und intraperitonealen habe ich besondere Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung der Hautinfektion nicht getroffen. Wie der Ausfall der Versuche zeigt, war dies auch gar nicht nötig. Es kam niemals vor, daß bei den iv. oder ip. geimpften und verendeten Tieren der Krankheitsverlauf oder der Sektionsbefund auf eine stattgehabte Hautinfektion hindeutete.

Es zeigte sich nun in mehreren Versuchen (3, 4, 7, 8 und 9 der Tabelle), daß die Tierinfektion noch mit kleineren Keimmengen gelang, als in vitro zur Vermehrung kamen. In anderen Versuchen (2, 5 und 6 der Tabelle)

---

[1]) Nach dem Fortgang von Herrn Dr. *Uchida* ist eine Anzahl von Versuchen durch Fräulein *H. Gutdeutsch* weitergeführt worden.

lag umgekehrt die Wachstumsgrenze in vitro tiefer, als der kleinsten noch in vivo wirksamen Dosis entsprach. In den Versuchen 1 und 10 fielen die in vitro und in vivo ermittelten Grenzen zusammen. Die in der erstgenannten Gruppe von Versuchen beobachtete *Entwicklungshemmung der Milzbranderreger in künstlicher Kultur* war fast durchweg sehr geringfügig, im Versuch 4 kam allerdings in künstlicher Kultur nur $^1/_{1000}$ Öse Kultur zur Vermehrung, während eine Infektion der Tiere noch mit $^1/_{1\,000\,000}$, also mit der 1000 mal kleineren Keimmenge, gelungen ist. Ähnliche Beobachtungen habe ich gelegentlich meiner Meerschweinchenversuche gemacht; bei der Besprechung derselben (III. Mitteilung) werde ich auf die aus solchen Befunden zu ziehenden Schlußfolgerungen näher eingehen. Mit Rücksicht auf die beobachtete Entwicklungshemmung in vitro habe ich in der Tabelle entsprechend den Versuchen 3, 4, 7, 8 und 9 der Bestimmung der Keimzahl pro 1 Öse Kultur bzw. 1 ccm Organaufschwemmung *die kleinste noch im Tierversuch wirksame Keimmenge* zugrunde gelegt.

Unter den Versuchen, welche eine *Virulenzabschwächung der Bacillen* ergeben haben (2, 5 und 6) betreffen 2 Versuche (2 und 5) *Reinkulturen*, und zwar einmal stark versporte, das andere Mal sporenfreie Milzbrandbacillen. Nur der Versuch 6 war mit tierischen Bacillen angestellt. Auch für diesen Versuch möchte ich eine Virulenzabschwächung der Bakterien annehmen, trotzdem 1 Tier nach Verimpfung von 1 Milliardstel Öse subcutan an Milzbrand verendet ist. Es überlebten aber 5 mit der gleichen Dosis infizierte und 6 mit der zehnfach größeren Dosis geimpfte. In Kultur war $^1/_{100}$ Mi. und $^1/_1$ Ma. ccm Organaufschwemmung zur Vermehrung gekommen. Derartige Beobachtungen würden, falls sie sich bestätigen, dafür sprechen, daß Milzbrandbacillen *auch nach Passage durch ein augenscheinlich höchstempfängliches Versuchstier an Virulenz einbüßen können.*

Einzelheiten der Versuchsanordnung sind aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich.

Die Tabelle läßt erkennen, daß *mehrfach die subcutane Infektion noch mit kleineren Mengen der Milzbranderreger gelungen ist als die intraperitoneale und intravenöse* (Versuche 1, 3 und 4).

Auch in den Versuchen 5 und 6 ist scheinbar die Haut etwas empfindlicher als Bauchfell und Blutweg. Allerdings starben im Versuch 5 beide mit $^1/_1$ Mi. sc. geimpfte Mäuse mit Zeichen schwerer Peritonitis und ohne charakteristisches Hautödem nach sehr kurzer Zeit; vielleicht ist hier der Tod infolge Übergreifens der Infektion auf die Bauchhöhle erfolgt, oder die Tiere sind versehentlich ip. anstatt sc. geimpft worden. Im Versuch 6 ist nur ein einziges Tier, und zwar ein mit $^1/_1$ Ma. ccm subcutan infiziertes, mit typischem Befund gestorben; das Ergebnis kann aber durch Zufall bedingt sein. Derartige Zufälligkeiten lassen sich ja beim Arbeiten mit kleinsten Bakterienmengen niemals ausschließen.

Die Versuche 1, 3 und 4, bei denen die subcutane Infektion sich deutlich als gefährlicher erwies, betreffen sämtlich *versporte Bacillen von Agarkulturen* und offenbar Bacillen höchster Virulenz.

Tabelle. *Parenterale Infektion von Mäusen mit Milzbrandsporen und Bacillen.*

Nr. des Versuchs	Verimpftes Material	Zahl d. Keime pro 1 Öse Kultur bzw. 1 ccm Organaufschwemmung	Dosis	Infektionserfolg[1])		
				subcutan	intravenös	intraperitoneal
1	Mäßig reichlich versporte Agarkultur (24 Std. alt)	100 Mi.	$^1/_{100\,000}$	$\dagger_6\ \dagger_6$	$\dagger_1\ \dagger_1$	$\dagger_1\ \dagger_2$
			$^1/_1$ Mi.	$\dagger_4\ \dagger_6$	$\dagger_1\ \dagger_2$	$\dagger_2$ lebt
			$^1/_{10}$ "	$\dagger_4\ \dagger_6$	leben	leben
			$^1/_{100}$ "	$\dagger_6\ \dagger_6$	"	"
2	Stark versporte Agarkultur (5 Tage alt)	100 000	$^1/_{1000}$	$\dagger_3\ \dagger_4$	$\dagger_1\ \dagger_2$	$\dagger_2\ \dagger_3$
			$^1/_{10\,000}$	$\dagger_2\ \dagger_4$	$\dagger_1\ \dagger_2$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{100\,000}$	leben	leben	leben
			$^1/_1$ Mi.	"	"	"
3	Stark versporte Agarkultur (7 Tage alt)	1 Mi.	$^1/_1$ "	$\dagger_5\ \dagger_5$	$\dagger_2$ lebt	"
			$^1/_{10}$ "	leben	leben	"
			$^1/_{100}$ "	"	"	"
4	Stark versporte Agarkultur (9 Tage alt)	1 Mi.	$^1/_1$ "	$\dagger_5\ \dagger_5$	"	"
			$^1/_{10}$ "	leben	"	"
			$^1/_{100}$ "	"	"	"
5	Sporenfreie Bacillen Gelatinekultur (24 Std. alt)	10 Mi.	$^1/_{100\,000}$	$\dagger_5\ \dagger_{10}$	$\dagger_1\ \dagger_1$	$\dagger_2\ \dagger_3$
			$^1/_1$ Mi.	$\dagger_2\ \dagger_3$ [2])	leben	leben
			$^1/_{10}$ "	leben	"	"
			$^1/_{100}$ "	"	"	"
6	Bacillen in Milzaufschwemmung (Maus)	1 Ma.	$^1/_1$ "	$\dagger_3\ \dagger_4$	$\dagger_1\ \dagger_1$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{10}$ "	$\dagger_5\ \dagger_5$	$\dagger_1\ \dagger_1$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{100}$ "	leben	leben	leben
			$^1/_1$ Ma.	$\dagger_4$ lebt	"	"
7	Bacillen in Milzaufschwemmung (Maus)	100 Mi.	$^1/_{100\,000}$	$\dagger_2\ \dagger_4$	•	$\dagger_1\ \dagger_1$
			$^1/_1$ Mi.	$\dagger_4\ \dagger_6$	•	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{10}$ "	$\dagger_4\ \dagger_6$	•	$\dagger_2\ \dagger_3$
			$^1/_{100}$ "	$\dagger_4\ \dagger_4$	•	$\dagger_2\ \dagger_3$
8	Bacillen in Milzaufschwemmung (Maus)	100 Mi.	$^1/_1$ "	$\dagger_4\ \dagger_4$	$\dagger_2\ \dagger_2$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{10}$ "	$\dagger_4\ \dagger_4$	$\dagger_2\ \dagger_2$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{100}$ "	$\dagger_3$ lebt	leben	$\dagger_3$ lebt
			$^1/_1$ Ma.	leben	"	leben
9	Bac. in Milzaufschw. (Meerschweinchen)	100 Mi.	$^1/_{10}$ Mi.	$\dagger_3\ \dagger_4$	$\dagger_3$	$\dagger_3$ lebt
			$^1/_{100}$ "	$\dagger_4\ \dagger_4$	$\dagger_7\ \dagger_9$	$\dagger_3$ "
10	Bacillen in Milzaufschwemmung (Meerschweinchen)	100 Mi.	$^1/_{100\,000}$	$\dagger_4\ \dagger_4$	$\dagger_1\ \dagger_1$	$\dagger_1\ \dagger_1$
			$^1/_1$ Mi.	$\dagger_3\ \dagger_3$	$\dagger_1\ \dagger_2$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{10}$ "	$\dagger_3\ \dagger_3$	$\dagger_1\ \dagger_2$	$\dagger_2\ \dagger_2$
			$^1/_{100}$ "	$\dagger_5\ \dagger_5$	$\dagger_2$ lebt	$\dagger_2\ \dagger_3$
			$^1/_1$ Ma.	leben	leben	leben

$\dagger_6$ = Tod nach 6 Tagen an Milzbrandsepsis. 2 M. = 2 Mäuse. 1 Mi. = 1 Million, 1 Ma. = 1 Milliarde. $^1/_{10}$ Mi. = ein Zehnmillionstel.

---

[1]) Für jede Dosis und Infektionsart 2 Mäuse. Nur in Versuch 9 wurde mit $^1/_{10}$ Mi. iv. nur eine Maus geimpft.

[2]) Beide Mäuse zeigten hochgradige Peritonitis und kein gelatinöses Hautödem.

Sehr auffallend ist nun, daß selbst in den Versuchen 1 und 3 — der Versuch 4 scheidet aus, da hier die ip. und iv. Infektion ganz erfolglos war — diejenigen ip. und iv. geimpften Mäuse, bei denen die Infektion angegangen ist, *durchweg früher starben als die subcutan infizierten.* Derselbe Sachverhalt ergibt sich für die Versuche 2, 7, 8 und 10, bei denen kleinste Bacillenmengen (1—10 Bacillen) sowohl von der Haut aus wie von der Bauchhöhle und dem Blutwege aus noch wirksam waren.

Im Versuch 9 ist die Lebensdauer der beiden mit $^1/_{100}$ Mi. iv. infizierten Mäuse eine auffallend lange (7 und 9 Tage!). Es ist mir nicht möglich, diese Unregelmäßigkeit befriedigend zu erklären. Vielleicht spielen Resistenzverschiedenheiten der Tiere eine gewisse Rolle, wenn auch der regelmäßige Ausfall der anderen Versuche eher dagegen spricht und mehr für die Annahme von *Veränderungen der Virulenz* der in diesem Versuch benutzten Milzbrandbacillen.

Zählen wir unter Einschluß der Versuche 5 und 9 mit abweichendem Ergebnis die an der Infektion verendeten Tiere, andererseits die Krankheitstage zusammen und berechnen hieraus die durchschnittliche Lebensdauer für die einzelnen Infektionsarten, so ergibt sich, *daß die subcutan infizierten Mäuse im Durchschnitt doppelt so lange leben wie die intravenös und intraperitoneal infizierten. Bei den Subcutantieren beträgt die Lebensdauer 4 Tage, bei den anderen Tieren 2 Tage.*

Viel stärker treten die Unterschiede hervor, wenn wir nicht die Summen vergleichen, sondern die Krankheitsdauer *der mit gleichen Dosen infizierten Mäuse in den einzelnen Versuchen.* Dabei sehen wir noch, daß die intravenös infizierten in den meisten Versuchen nicht nur wesentlich schneller sterben als die von der Haut aus geimpften, sondern auch im allgemeinen schneller als die Peritonealtiere.

Daß der Tod der ip. und iv. infizierten Mäuse nicht etwa auf Hautinfektion zurückzuführen ist, geht deutlich aus 2 Momenten hervor. Erstens dem fast durchweg schnelleren Verlauf der Erkrankung bei diesen Tieren und zweitens für die Peritonealtiere auch aus dem Befund einer hochgradigen Peritonitis mit eigentümlich sulzigem, sehr bacillenreichem Exsudat, ein Befund, der auf primäre Infektion des Bauchfells hindeutet.

Die schwere Peritonitis fehlte bei keinem der ip. infizierten Tiere, bei subcutan geimpften fand sie sich, abgesehen von den beiden Tieren des Versuchs 5, niemals. Die von der Haut aus infizierten und an Sepsis verendeten Mäuse wiesen fast regelmäßig ein gelatinöses Exsudat der Subcutis auf, ausgehend von der Impfstelle. Es fehlte indessen dreimal, nämlich bei der mit $^1/_{100}$ Mi. subcutan infizierten Maus des Versuchs 8 und bei den obenerwähnten Tieren des Versuchs 5 mit dem Befund der schweren Peritonitis. Bei den nach iv. Infektion verendeten Tieren fehlte die charakteristische Peritonitis wie auch das Hautödem.

Eine Milzschwellung wurde auffallenderweise nicht selten ganz vermißt, manchmal war sie hochgradig. Im allgemeinen fand sich eine Milzschwellung nach ip. und iv. Infektion häufiger als nach subcutaner.

Es ist nun bemerkenswert, daß die höhere Empfänglichkeit der Haut, verglichen mit der Empfänglichkeit der Bauchhöhle und des Blutgefäßsystems, *gemessen an der kleinsten noch wirksamen Dosis*, fast ausschließ-

lich in Versuchen mit *versporter* Agarkultur hervortrat, und zwar auch nur, wenn Sporenkulturen maximaler Virulenz verimpft wurden (Versuche 1, 3 und 4). Der Versuch mit der Gelatinekultur ist in dieser Beziehung schwer zu deuten wegen des bereits erwähnten atypischen Befundes der beiden Subcutanmäuse. In 5 Versuchen mit sporenfreien Milzbrandbacillen war nur einmal (Versuch 6) die Haut anscheinend etwas empfindlicher als Bauchhöhle und Blutgefäßsystem. Der Tod der mit ein Milliardstel ccm Organaufschwemmung subcutan infizierten Maus beruht aber möglicherweise auf Zufall. In den übrigen 4 Versuchen mit „tierischen" Bacillen war *die Dosis letalis minima bei den Tieren für alle drei Infektionsarten die gleiche.*

Ein endgültiges Urteil über die Ursache dieses verschiedenen Verhaltens von Milzbranderregern aus Agarkulturen und sporenfreien „tierischen" Bacillen ein und desselben Milzbrandstammes läßt sich erst aus weiteren derartigen Versuchen, im besonderen mit anderen Milzbrandstämmen verschiedener Herkunft und verschiedener Virulenz, gewinnen. Denn es ist keineswegs auszuschließen, daß der von mir beobachtete Sachverhalt an die Verwendung eines bestimmten Milzbrandstammes geknüpft ist. Für die Annahme, daß unabhängig von dem benutzten Stamm Sporen bei parenteraler Verimpfung auf Mäuse eine *andere Wirkung* zukommt als „tierischen" sporenfreien Bacillen, sei es nun eine geringere Virulenz bei intraperitonealer und intravenöser Verimpfung, sei es eine höhere Virulenz bei subcutaner Infektion, dafür spricht, daß Sporen *auch bei natürlicher Infektion von der Haut, dem Verdauungstraktus und wahrscheinlich auch von den Lungen aus ganz anders wirken, und zwar hier viel stärker als Bacillen.*

Schlußsätze.

1. Die künstliche Infektion von Mäusen mit Milzbrandsporen und Bacillen gelingt *auch vom Blutwege und von der Bauchhöhle aus.*

2. Bei subcutaner Infektion waren allerdings kleinere Mengen der Erreger noch wirksam als bei intravenöser und intraperitonealer, *aber nur, wenn sporenhaltige Agarkulturen höchster Virulenz verimpft wurden*; bei Verimpfung *sporenfreier „tierischer" Bacillen* ist die Dosis letalis minima *für die drei Infektionsarten augenscheinlich die gleiche.*

3. Fast in allen Versuchen, gleichgültig, ob Sporen oder Bacillen injiziert wurden, *starben die intraperitoneal und intravenös infizierten Mäuse früher als die mit den gleichen Dosen subcutan geimpften.* Insoweit zeigen also bei Mäusen *Blutgefäßsystem und Bauchhöhle sogar eine höhere Empfänglichkeit für die Milzbrandinfektion als das Subcutangewebe.*

Literaturverzeichnis.

Besredka, Die lokale Immunisierung. (Deutsch von G. Blumenthal.) J. A. Barth, Leipzig 1926. — *Sobernheim* und *Murata*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 691. 1924.

(Aus der Seuchenabteilung des Instituts „Robert Koch“.
Abteilungsleiter: Prof. *B. Lange*.)

Experimentelle Infektionen von Mäusen und Meerschweinchen parenteral und von den natürlichen Eingangspforten aus.

III. Mitteilung.

Versuche an Meerschweinchen mit Milzbranderregern, Bacillen der hämorrhagischen Septicämie und anderen pathogenen Bakterien.

Von
Dr. **Yoshiho Uchida**, Kânazawa (Japan).

In der I. und II. Mitteilung[1]) konnte ich über Experimente *an Mäusen* mit Milzbrand- und anderen Septicämieerregern berichten, die in Fortsetzung der Arbeiten von *B. Lange*, *Keschischian* und *Nowosselsky* ausgeführt worden sind und in erster Linie zum Ziel hatten, die Bedingungen der Infektion auf den natürlichen Wegen (von der Haut, dem Darmkanal, den Lungen aus) näher zu erforschen.

Es war nun von Interesse, zu erfahren, inwieweit die Befunde bei der Infektion *eines anderen Versuchstieres* den an Mäusen gewonnenen Erfahrungen entsprechen. Ich habe deshalb Versuche an *Meerschweinchen* angestellt, und zwar mit Milzbranderregern, dem Bacillus bipolaris septicus (Hühnercholera, hämorrhag. Septicämie), Paratyphus-B-Bakterien und mit Tuberkelbacillen. In meiner Arbeit habe ich ferner einige noch nicht mitgeteilte Versuche von *B. Lange* mit gleichartiger Versuchsanordnung aufgenommen, im besonderen Versuche an Meerschweinchen mit Pneumokokkenstämmen, die aus Fällen spontaner Pneumokokkensepsis des Meerschweinchens isoliert waren.

I. Versuche mit Milzbranderregern.

Gelegentlich der Besprechung meiner Experimente an Mäusen (I. Mittlg.) habe ich hingewiesen auf die Widersprüche in den bisherigen Arbeiten über die experimentelle Infektion mit Milzbranderregern. Bevor ich auf meine Versuche an Meerschweicnhen mit Infektion auf den natürlichen Wegen eingehe, will ich kurz über Experimente berichten, die sich mit der Empfänglichkeit verschiedener Gewebe bei *parenteraler Infektion* mit Milzbrand beschäftigen.

[1]) Zeitschr. f. Hyg. **106**, S. 96 und 275.

Bekanntlich bildeten Milzbrandversuche an Meerschweinchen den Ausgangspunkt für die Theorie *Besredkas*, nach welcher von allen Organen die Haut allein für die Milzbrandinfektion empfänglich ist[1]).

Nun konnten *Combiesco*, *Bachmann*, *Beltrami* und *Romat*, *Wollman*, *Gratia*, *Adelheim*, *Sobernheim* und *Murata*, *Katzu* u. a. zeigen, daß sich Tiere auch auf intramuskulärem, intraperitonealem, intravenösem, intrakardialem, intrapulmonalem und subduralem Wege mit Milzbranderregern tödlich infizieren lassen, wenn man nur genügend große Mengen hochvirulenter Keime verimpft. In den gen. Versuchen war auf Vermeidung der Hautinfektion bei der Impfung sorgfältig geachtet worden. Hiernach ist die Anschauung von der *alleinigen* Empfänglichkeit des Hautorgans als unrichtig nachgewiesen worden; andererseits tritt aber in den meisten Arbeiten *die elektive Empfänglichkeit der Haut* — wenigstens für die künstliche parenterale Infektion — aufs deutlichste hervor.

Ein besonderes Interesse beanspruchen in dieser Hinsicht die Arbeiten von *Sobernheim* und *Murata*, auch von *Katzu*, und zwar deswegen, weil in ihnen die Empfänglichkeit der verschiedenen Gewebe gegen parenterale Milzbrandinfektion nicht bloß qualitativ, sondern auch *quantitativ vergleichend* untersucht ist. Eine Ergänzung dieser Untersuchungen schien mir nur insofern wünschenswert, als sie sich lediglich auf *Kulturbacillen*, und zwar auch nur auf bereits *versporte* Kulturen beziehen. Über die Widerstandsfähigkeit verschiedener Körpergewebe sog. *tierischen* Bacillen gegenüber liegen exakte quantitative Prüfungen nicht vor. Nach den Beobachtungen von *Wollman* muß vermutet werden, daß Resistenzunterschiede der Gewebe auch bei Verimpfung von Milzbrandbacillen aus tierischen Organen zutage treten. Es ist keineswegs ohne weiteres vorauszusetzen, daß sich in dieser Hinsicht Sporen und Bacillen, Erreger in Kultur und in tierischen Organen gleich verhalten. In meinen Versuchen an Mäusen traten jedenfalls gewisse Unterschiede zutage.

Die Ergebnisse meiner eigenen Experimente mit parenteraler Infektion sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengestellt. Von Versuchen mit sporenhaltigen Bacillen habe ich mit Rücksicht auf die eindeutigen Resultate besonders von *Sobernheim* und *Murata* ganz abgesehen. In den Versuchen 1—3 der Tabelle wurden zwanzigstündige Gelatinekulturen verimpft, die so gut wie sporenfrei waren, im Versuch 4 die Milzaufschwemmung einer an Milzbrand verendeten Maus, im Versuch 5 die Milzaufschwemmung eines Meerschweinchens. Beide Aufschwemmungen enthielten in ihrer Form gut erhaltene mit Kapseln versehene Bacillen in großer Zahl.

Für diese wie für alle weiteren Versuche geschah die Infektion mit dem in der I. Mitteilung erwähnten Stamm Km., der für Meerschweinchen hochvirulent

[1]) Auf die Frage der künstlich erworbenen Hautimmunität soll hier nicht eingegangen werden.

ist. Um eine Hautinfektion bei der peritonealen und intravenösen Infektion zu vermeiden, ging ich in folgender Weise vor. Um die Injektion in die Bauchhöhle auszuführen, legte ich durch Hautschnitt ein etwa linsengroßes Stück des Bauchfells frei. An dieser Stelle wurde die Kulturaufschwemmung injiziert, mit Kochsalzlösung nachgespritzt und nach Herausziehen der Kanüle die Hautwunde mittels glühenden Metallspatels verschorft. Bei der intravenösen Injektion, die an einer Schenkelvene vorgenommen wurde, legte zunächst ein Hautschnitt die Vene frei, in diese wurde die Injektion gemacht, Kochsalzlösung nachgespritzt und schließlich die Hautwunde in gleicher Weise verschorft. Die Versuche zeigen, daß bei Beachtung dieser Kautelen und Einspritzung kleinster Keimmengen die Hautinfektion in der Tat vermieden werden kann. Sonst hätten bei der intraperitonealen und intravenösen Injektion mit einer von der Haut aus sicher tödlichen Keimmenge sämtliche Tiere an Milzbrandsepsis eingehen müssen. Die Tatsache, daß einige Tiere diese Art der Infektion überstehen, beweist das Einwandfreie der Versuchstechnik.

Zur Bestimmung der pro 1 Öse Kultur bzw. 1 ccm Organaufschwemmung enthaltenen Keimmenge gab das Kulturverfahren, und zwar sowohl das Verdünnungsverfahren mit Bouillon wie auch das Ausgießen eines Bakterienagargemisches zu Platten nicht so ganz selten zu kleine Werte. Es zeigte sich nämlich hie und da, daß Keimmengen, welche in künstlicher Kultur nicht mehr zur Vermehrung gelangt waren, noch Meerschweinchen oder in einzelnen Kontrollversuchen auch Mäuse infizierten. Ähnliche Beobachtungen habe ich in Versuchen mit sporenhaltiger Kultur gemacht. Wenn auch in solchen Fällen in der Regel die kleinste im Tierkörper noch wirksame Bakterienmenge nur etwa 10 mal kleiner war als diejenige Menge, welche in künstlicher Kultur zur Vermehrung kam, so war die Differenz manchmal doch auch beträchtlich (z. B. 1 : 1000); es kommt also vor, daß Milzbrandkeime in künstlicher Kultur einer mehr oder minder starken Entwicklungshemmung unterliegen.

Aus dem erwähnten Umstand ergibt sich für die von mir angewandte Feststellung der Virulenz meiner Milzbrandkulturen, die ja auf einem Vergleich der kleinsten noch infizierenden Keimmenge mit der kleinsten noch in vitro auswachsenden Menge beruht, daß die Entwicklungshemmung der Milzbranderreger in vitro eine maximale Virulenz dem Meerschweinchen gegenüber unter Umständen *vortäuscht*. Andererseits kann aber natürlich, wenn die noch in vitro auskeimenden Erreger im Tierversuch versagen, mit Sicherheit auf eine abgeschwächte Virulenz geschlossen werden. Wie die nachfolgenden Versuche (Tab. 1 und 2) zeigen werden, war die Virulenz mehrerer von mir benutzter *Kulturen* des Stammes Km. leicht abgeschwächt, während die Kontrollprüfung der *Organverreibungen* nur in einem Fall eine nicht maximale Virulenz ergab (Versuch 6, Tab. 1).

Bei der Berechnung der Anzahl Keime pro 1 Öse Kultur bzw. 1 ccm Organaufschwemmung wurde neben dem kulturellen Ergebnis stets auch der Tierversuch verwertet, sofern dieser mit Verimpfung noch kleinerer Keimmengen positiv ausfiel, als der Wachstumsgrenze des Ausgangsmaterials in vitro entsprach.

Nach den Versuchen der Tabelle 1 gelingt es, auch mit sporenfreien Kulturbacillen und „tierischen" Bacillen Meerschweinchen auf intravenösem und intraperitonealem Wege tödlich zu infizieren. Mit Ausnahme der in der Tabelle gekennzeichneten 2 Tiere des Versuches 6, welche für die Beurteilung ausscheiden müssen, war niemals bei den iv. und ip. infizierten Tieren ein Hautödem nachzuweisen, weder intra vitam noch bei der Sektion. Es hat also die Infektion in diesen Fällen

Tabelle 1. *Parenterale Infektion von Meerschweinchen mit sporenfreien Kulturbacillen und „tierischen" Bacillen.*

Nr. des Versuchs	Verimpftes Material	Anzahl der Keime in 1 Öse bzw. 1 ccm	Kleinste tödliche Dosis in Ösen bzw. Kubikzentimeter		
			subcutan	intravenös	intraperitoneal
1	Gelatinekultur	10000000	1/100000 $\dagger_2$ 1/1000000 lebt	1/100000 lebt	1/100000 lebt
2	„	10000000	1/10000000 $\dagger_3$ (Grenze nicht erreicht)	1/100000 $\dagger_2$ 1/1000000 lebt	1/100000 lebt
3	„	1000000	1/100000 $\dagger_3$ 1/1000000 $\dagger_3$ 1/10000000 lebt	1/100000 $\dagger_3$ 1/1000000 $\dagger_3$ 1/10000000 lebt	1/100000 lebt
4	„	10000000	1/10000000 $\dagger_4$ 1/100000000 lebt	1/1000000 $\dagger_4$ 1/10000000 lebt	1/1000 $\dagger_3$ 1/100000 lebt
5	Milzaufschwemmung Maus	100000000	1/10000000 $\dagger_3$ 1/100000000 $\dagger_4$	—	1/1000 $\dagger_2$ (2 M) 1/100000 leben (2 M)
6	Milzaufschwemmung Meerschweinchen	1000000[1]	1/1000000 $\dagger_3$ 1/10000000 $\dagger_5$ 1/100000000 lebt	1/100000 1 M lebt 1/10000000 leben (2 M)	1/1000 $\dagger_3$ 1/100000 2 M $\dagger_3$ (H. I.) 1 M $\dagger_3$ (trächtig) 1/10000000 leben (2 M)

$\dagger_2$ = Tod an Milzbrand nach 2 Tagen.
H. I. = Hautinfektion. Wo diese Bemerkung bei den intravenös und peritoneal inf. Tieren fehlt, waren bei der Sektion Zeichen der Hautinfektion nicht nachweisbar.

offenbar nicht von der Haut, sondern vom Blutgefäßsystem bzw. vom Bauchfell ihren Ausgang genommen. Dafür spricht übrigens auch die hochgradige Peritonitis der ip. geimpften und verendeten Tiere. Eine derartig starke Bauchfellentzündung wird bei Meerschweinchen, die auf anderem Wege infiziert werden, nicht beobachtet.

Andererseits geht aus den Versuchen aufs deutlichste hervor, daß das *Hautorgan für die Infektion eine elektive Empfänglichkeit* besitzt. Es ist in dieser Beziehung augenscheinlich zwischen Kulturbacillen und tierischen Bacillen und zwischen Sporenbacillen und sporenfreien Bacillen kein Unterschied.

Für eine erfolgreiche Infektion mit Gelatinekulturbacillen auf intravenösem Wege mußte im Versuch 4 das Zehnfache, im Versuch 2 das Einhundertfache der auf subcutanem Wege tödlichen Dosis angewandt werden. Merkwürdigerweise war im Versuch 3 zwischen der subcutanen

[1]) Zwei mit 1/100000000 ccm subcutan geimpfte *Mäuse* starben beide nach 5 Tagen an Milzbrandsepsis.

und intravenösen Infektion überhaupt kein Unterschied vorhanden. Vielleicht hängt diese Unregelmäßigkeit mit Resistenzverschiedenheiten der einzelnen Tiere zusammen.

Noch größere Dosen als vom Blutwege aus mußten bei intraperitonealer Verimpfung der Bacillen angewendet werden, um eine tödliche Infektion zu erzielen. Während die Dosis letalis minima für die subcutane Infektion mehrfach bei $^{1}/_{10\,000\,000}$ bis $^{1}/_{100\,000\,000}$ Öse lag, konnte auf ip. Wege, abgesehen von einem Fall, niemals mit $^{1}/_{100\,000}$ Öse eine Infektion erzielt werden. Das Tier im Versuch 6, das dieser Dosis erlag, war trächtig und offenbar für die Infektion von der Bauchhöhle aus disponiert.

Die Unterschiede zwischen der subcutanen und intraperitonealen bzw. intravenösen Impfung treten in meinen Versuchen, abgesehen von Versuch 3 (intravenöse Impfung), noch stärker hervor als bei *Sobernheim* und *Murata*. Wahrscheinlich ist die Widerstandsfähigkeit des Blutgefäßsystems und des Bauchfells sporenfreien Bacillen gegenüber eine noch höhere als gegen Sporen. Wichtig scheint mir ferner die Feststellung, daß *die höhere Resistenz des Blutgefäßsystems und des Bauchfells auch „tierischen" Bacillen gegenüber* ausgesprochen ist, die also in bezug auf ihre Aggressivität den einzelnen Geweben gegenüber sich nicht grundsätzlich anders verhalten als hochvirulente Kulturbacillen.

Die eigentümliche Erscheinung, die ich in meinen Versuchen an der Maus (Mittlg. II) nachweisen konnte, daß nämlich in gewisser Hinsicht Blutweg und Bauchhöhle eine höhere Empfänglichkeit besitzen als die Haut, konnte ich an Meerschweinchen, trotzdem die gleiche Kultur benutzt wurde, nicht beobachten. Im besonderen konnte eine kürzere Lebensdauer der erfolgreich ip. oder iv. infizierten Meerschweinchen den subcutan geimpften gegenüber niemals festgestellt werden. Es scheint hier ein Unterschied im biologischen Verhalten der Organe beider Tierarten vorzuliegen.

Wende ich mich nun meinem eigentlichen Thema, *der natürlichen Infektion*, zu.

Hier fehlt es, soviel mir bekannt ist, ganz an Untersuchungen, die unter sorgfältiger Berücksichtigung der Mengenverhältnisse und der Virulenz der verwandten Erreger die Empfänglichkeit der natürlichen Eingangspforten vergleichend abschätzen. Seit *Buchners* Experimenten ist man in dieser Frage eigentlich nicht viel weiter gekommen.

Zur Technik meiner eigenen Versuche sei folgendes bemerkt: In jedem Versuch wurde die Virulenz der benutzten Kultur bzw. Organaufschwemmung durch subcutane Verimpfung kleinster abgestufter Mengen kontrolliert. Unter den 8 Versuchen der nachstehenden Tabelle war dreimal (Versuch 3, 6 und 7) die Virulenz nicht maximal, allerdings noch ziemlich hoch.

Die percutane Infektion geschah so, daß den Tieren die in der Tabelle angegebenen Mengen der Erreger in 2 Tropfen Kochsalzlösung auf die geschorene Haut des Bauches verbracht und in diese 1 Min. lang eingerieben wurden. Bei

der Fütterungsinfektion erhielten die Tiere 2 Tropfen einer Aufschwemmung von Milzbranderregern mittels Pipette in das geöffnete Maul. Bei den Inhalationsversuchen wurden die Erreger verspravt und die Meerschweinchen gezwungen, in Blechhülsen, aus denen nur der Kopf herausragte, im Kasten fixiert, diesen feinen Bakteriennebel einzuatmen. Der von *Gramatschikoff, Snel* u. a. gegen diese Versuchsanordnung erhobene Vorwurf, die hierbei zustande kommenden Infektionen seien möglicherweise nicht von den Lungen, sondern von den Schleimhäuten des Nasenrachenraums ausgegangen, ist, wie schon *Buchner* mit Recht betont, dann hinfällig, wenn nachgewiesen wird, daß die Infektion durch Einatmung der Erreger wesentlich leichter gelingt als durch Verfütterung, was in der Tat der Fall ist, wie die Tabelle auch meiner Versuche zeigt. Ebensowenig führt, wie ich in Kontrollversuchen an Mäusen und Meerschweinchen nachweisen konnte, die Befeuchtung des Felles der Tiere mit Sporenaufschwemmung, die sich bei Inhalationsversuchen niemals ganz vermeiden läßt, zu einer *von der Haut ausgehenden* Infektion. Die Expositionsdauer der Tiere betrug in meinen Inhalationsversuchen 1 Stunde. Sofort danach wurde ein Meerschweinchen aus jeder Serie durch Chloroform getötet, die Lungen von den gröberen Bronchien abpräpariert und eine möglichst gleichmäßige Aufschwemmung der fein zerschnittenen Organe in Kochsalzlösung hergestellt. Mit dieser Aufschwemmung wurden dann in Verdünnungen 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64 usw. Bouillonröhrchen beimpft und die Wachstumsgrenze ermittelt. Der Wachstumsgrenze entspricht die in den Tabellen angegebene Keimzahl[1]).

Einzelheiten der Versuche sind aus der Tabelle ersichtlich.

Die Versuche lassen zunächst eine recht starke Wirkung der Sporen und Bacillen *von der Haut aus* erkennen: 1 Öse — $^1/_{10}$ Öse führte regelmäßig zur Infektion, der Erfolg der Verimpfung von $^1/_{100}$—$^1/_{1000}$ Öse bzw. Kubikzentimeter war unsicher, Sporen wirkten vielleicht etwas stärker als Bacillen. Die Dosis von $^1/_{100\,000}$ Öse bzw. Kubikzentimeter hatte bei 10 Tieren in drei Versuchen keinen Erfolg.

Hierdurch ist nicht nur bewiesen, daß eine Infektion bei Meerschweinchen von der unverletzten Haut aus mit Milzbranderregern *möglich* ist — dieser Befund konnte ja schon von *Roth, Machnoff, Wasmuth* und *Fritsche*[2]) erhoben werden —, sondern auch, daß die Infektion *noch mit ziemlich kleinen Mengen von Sporen und von Bacillen* gelingt.

Meine *Fütterungsexperimente* hatten ein ganz negatives Resultat trotz Verwendung sehr großer Mengen der Erreger. Wahrscheinlich hätte eine weitere Steigerung der verfütterten Sporenmengen doch hie und da zu einem positiven Ergebnis geführt. Dafür sprechen die Erfahrungen anderer Autoren, z. B. von *Buchner, Nikolsky, Sobernheim* und *Murata*. Mindestens kann aber aus meinen Versuchen der Schluß gezogen werden, daß die orale Infektion von Meerschweinchen selbst mit großen Mengen höchst virulenter Sporen häufig erfolglos ist.

Der Erfolg der *Inhalationsexperimente* (Versuch 1 und 2) muß demnach auf Konto der *in die Lungen eingeatmeten* Sporen gesetzt werden.

---

[1]) Eine Korrektur fand in dem oben angegebenen Sinne nur dort statt, wo noch eine kleinere Keimmenge in vivo als in vitro zur Vermehrung gelangte.

[2]) Literatur bei *Koenigsfeld.*

Tabelle 2. *Natürliche Infektion von Meerschweinchen mit Milzbrandsporen und Bacillen.*

Nr. des Versuchs	Sporen? Bacillen?	Keimzahl in 1 Öse Kultur bzw. 1 ccm Organaufschwemmung	Virulenz bei subcutaner Verimpfung	Erfolg der Infektion		
				percutan	per os	per inhalationem
1	Sporen (2 Tage alte Agarkultur)	10 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ Öse †$_5$ (max.)	$^1/_{10}$ Öse 2 : 0 (†$_2$, †$_3$) $^1/_{100}$ " 2 : 0 (†$_3$, †$_4$) $^1/_{1000}$ " 2 : 1 (†$_3$)	1 Öse 2 : 2 $^1/_{100}$ " 2 : 2 $^1/_{1000}$ " 2 : 2	2 521 440 Keime 4 : 0 (†$_3$, †$_3$, †$_3$, †$_3$)
2	Sporen (2 Tage alte Agarkultur)	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ " †$_3$ → (wahrscheinl. max.)	$^1/_{100\,000}$ Öse 4 : 4	·	163 860 Keime 4 : 0 (†$_3$, †$_3$, †$_3$, †$_4$)
3	Sporen (3 Tage alte Agarkultur)	100 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ " †$_8$ $^1/_{100\,000\,000}$ " lebt	·	·	640 Keime 4 : 4
4	Bacillen (1 Tag alte Gelatinekultur)	1 000 000	$^1/_{1\,000\,000}$ " †$_3$ $^1/_{10\,000\,000}$ " lebt (max.)	1 Öse 2 : 0 (†$_3$, †$_5$)	1 Öse 2 : 2	·
5	Bacillen (1 Tag alte Gelatinekultur)	10 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ " †$_8$ (max)	$^1/_{10}$ " 2 : 0 (†$_3$, †$_3$) $^1/_{1000}$ " 2 : 1 (†$_4$)	1 Öse 2 : 2	640 Keime 4 : 4
6	Bacillen (1 Tag alte Gelatinekultur	100 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ " †$_3$ $^1/_{100\,000\,000}$ " lebt	$^1/_{100\,000}$ Öse 4 : 4	·	Keime kulturell nicht nachzuweisen.
7	Bacillen (1 Tag alte Gelatinekultur)	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ " †$_2$ $^1/_{1\,000\,000}$ " lebt	·	·	2560 Keime 3 : 3
8	Bacillen in Exsudat und Milzaufschwemmung	10 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ ccm †$_5$ (max.)	$^1/_{100}$ ccm 2 : 1 (†$_3$) $^1/_{100\,000}$ ccm 2 : 2	·	·

2 : 0 heißt: Von zwei infizierten Tieren sterben beide an Milzbrand. → = Grenze nicht erreicht. max. = maximal.

Im Versuch 1 waren ca. 2 500 000 Sporen von den Lungen aus wirksam, im Versuch 2 ca. 150 000 Sporen. 8 mit diesen Keimmengen auf aerogenem Wege pulmonal infizierte Meerschweinchen erlagen sämtlich einer Milzbrandsepsis. 640 Keime waren bei 4 Tieren unwirksam. Wie bei den Versuchen an Mäusen begegnete die Versprayung bacillenhaltiger Organaufschwemmungen und von Gelatinekulturen großen Schwierigkeiten. Es ist mir nicht gelungen, den Tieren eine genügend große Zahl sporenfreier Bacillen per inhalationem beizubringen (vgl. die Bemerkungen hierzu in der I. Mitteilung auf S. 104). Daß eine Inhalationsinfektion bei Meerschweinchen auch mit sporenfreien Bacillen gelingt, dafür sprechen die Beobachtungen von *Buchner*.

Meine Inhalationsversuche bestätigen die Ergebnisse von *Buchner*, *Enderlen*, *Muskatblüth* u. a.[1]). Sie zeigen zugleich, daß eine direkte Infektion der Lungen auf aerogenem Wege *mit Sporenmengen gelingt, die etwa der kleinsten auf percutanem Wege noch wirksamen Dosis entsprechen.*

Rechnen wir nämlich die in den Cutanversuchen in Bruchteilen einer Öse angegebenen Keimmengen unter Berücksichtigung der pro Öse kulturell nachgewiesenen Keimmenge auf *Keimzahlen* um, so ergibt sich folgendes: Wirksam waren 10 000 Keime (Versuche 1 und 5), unwirksam 100 (Versuch 8), 1000 (Versuch 6) und 10 000 (Versuch 2). 10 000 Milzbrandkeime hatten also nur bei 2 von 8 percutan geimpften Tieren Erfolg, also in 25%, während bei Inhalation ca. 150 000 Keime 100% der Tiere infizierten.

Es muß hierbei allerdings berücksichtigt werden, daß die angegebenen Keimzahlen bei der pulmonalen Infektion voll zur Wirkung kommen, während beim Einreiben in die Haut von der angegebenen Keimmenge offenbar ein nicht unbeträchtlicher Teil überhaupt nicht in die Haut eindringt. Bei den sofort nach der Inhalation getöteten Tieren hat eine Untersuchung von *Herzblut und Milz* auf Milzbranderreger nicht stattgefunden. 6 Versuche von *B. Lange* und *Keschischian*[2]) mit Inhalation von Milzbrandsporen bei Meerschweinchen, die zu anderem Zweck angestellt und an früherer Stelle mitgeteilt worden sind, hatten in dieser Hinsicht durchweg negative Resultate ergeben, eine Beobachtung, die mit den Erfahrungen *Buchners* gut übereinstimmt. Auch *Buchner* fand in seinen Fällen die Milz überwiegend frei von Milzbranderregern, obwohl er seine Inhalationstiere nicht sofort, sondern erst $4^1/_2$ Stunden nach der Inhalation tötete. Hiernach muß angenommen werden, daß im Gegensatz zum Organismus der Maus der Respirationsapparat des Meerschweinchens das sofortige Eindringen von Milzbrandsporen ins Blut in der Regel nicht gestattet.

Was den zeitlichen *Verlauf der Erkrankung* bei den auf natürlichem Wege infizierten Meerschweinchen betrifft, so fällt auf, daß niemals pro-

---

[1]) Literatur vgl. I. Mittlg. Zeitschr. f. Hyg. **106**, 96. 1926.

[2]) Zeitschr. f. Hyg. **104**, 256. 1925.

trahierte Erkrankungen beobachtet werden konnten, die Krankheitsdauer entsprach vielmehr durchaus derjenigen nach subcutaner Infektion mit kleinsten Bacillenmengen.

Bei den an Milzbrand verendeten Tieren waren keineswegs immer *an der Eingangspforte typische pathologisch anatomische Veränderungen* nachzuweisen. Bei der percutanen Verimpfung der Erreger war allerdings häufig das charakteristische gelatinöse Ödem der Haut und Subcutis vorhanden, aber z. B. im Versuch 4 fehlte es, trotzdem die Kultur von maximaler Virulenz war und die Tiere erst nach 5 Tagen verendeten. Auch die Erkrankung der Lymphdrüsen unter den Bauchdecken war nicht immer charakteristisch und unterschied sich manchmal nicht von den offenbar auf dem Blutwege zustande gekommenen Drüsenentzündungen. Es erscheint hiernach zweifelhaft, ob allein aus dem Fehlen des charakteristischen Hautödems mit Sicherheit auf ein Ausbleiben der Hautinfektion, z. B. bei peritonealer oder intravenöser Infektion der Erreger geschlossen werden darf.

Unter den 8 an Inhalationsmilzbrand verendeten Meerschweinchen zeigte nur eins ausgedehnte dunkelrote Hepatisation beider Lungen, also eine offenbar auf die Einatmung der Erreger zu beziehende Pneumonie, die übrigen hatten entweder gar keine makroskopisch erkennbaren Veränderungen der Lungen oder nur mehr oder weniger zahlreiche dunkelrote Herde (Bronchopneumonie). Diese Veränderungen fanden sich aber auch häufig bei Meerschweinchen, die subcutan, percutan oder auf anderem Wege infiziert waren. Übrigens trifft man bei in dieser Weise infizierten Tieren auch nicht so selten lobäre Pneumonien. Auch die entzündliche Schwellung der Trachealdrüsen bot bei den Inhalationstieren vielfach nichts Charakteristisches.

Auch *Buchner* fand bei seinen an Inhalationsmilzbrand verendeten Meerschweinchen teilweise die Lungen anscheinend ganz normal.

Buchner hat nun auch als erster über die Mengen der bei Inhalation tatsächlich in die Lungen eingeatmeten Milzbranderreger Beobachtungen angestellt. Er tötete Meerschweinchen unmittelbar nach der Inhalation von Sporen, zerschnitt einen bestimmten Teil der Lungen in kleine Stücke, vermischte diese mit Agar und goß das Gemisch zu Platten aus. Die Zahl der auf den Platten auswachsenden Kolonien gibt aber nur eine ungefähre Vorstellung von der Menge der tatsächlich inhalierten Keime, da wohl nicht alle im Inneren der Gewebsstücke befindlichen Keime zu isolierten Kolonien auswachsen. Aus diesem Grunde sind wahrscheinlich die von *Buchner* ermittelten Werte, die erheblich kleiner sind als die von mir gewonnenen, nur Minimalzahlen. Ob bei der trockenen Verstäubung von Milzbrandsporen, deren sich *Buchner* neben der Versprayung von Aufschwemmungen bediente, andere Infektionsbedingungen obwalten als bei der von mir angewandten Inhalationstechnik, könnte nur durch ad hoc angestellte vergleichende Untersuchungen mit trockener und feuchter Verstäubung entschieden werden.

Mit den Ergebnissen von *Buchner*, *Enderlen* und meinen eigenen stehen die Beobachtungen von *Gramatschikoff* und *Snel* keineswegs in Widerspruch. Die

Autoren, die eine umfangreiche Zerstörung der in die Lungen inhalierten Milzbranderreger feststellen konnten, experimentierten an *Kaninchen*. Die Tierart spielt aber vielleicht keine ausschlaggebende Rolle. Es steht ja nach meinen Experimenten fest, daß viele Hunderte von Milzbranderregern (sogar Sporen), auch in die Lungen des *Meerschweinchens* eingeatmet, restlos abgetötet werden, und auch da, wo die Inhalationsinfektion wirksam gewesen ist, können sehr ausgedehnte Schädigungen des größten Teils der inhalierten Erreger stattgefunden haben.

Wenn wir die an Meerschweinchen erhobenen Befunde mit den Ergebnissen meiner Mäuseversuche vergleichen, so ergeben sich bemerkenswerte Parallelen. Sowohl bei der Maus wie beim Meerschweinchen ist *die Haut für die Infektion mit Milzbranderregern hoch empfänglich*. Allerdings wirken Bacillen bei der Maus vom Hautorgan aus deutlich schwächer als Sporen, beim Meerschweinchen sind die Unterschiede zwischen Bacillen und Sporen anscheinend nur gering. Der Intestinaltraktus zeigt bei Maus und Meerschwein eine erhebliche Widerstandsfähigkeit der Infektion gegenüber. Die Lungen sind aber bei beiden Tierarten von beinahe gleicher Empfänglichkeit wie die unverletzte Haut. Mit *Bacillen* ist mir die Infektion von Mäusen und Meerschweinchen weder per os noch per inhalationem geglückt.

II. Versuche mit dem Bacillus bipolaris septicus (Hühnercholerabacillus, Pasteurellavirus).

Voges und später *Hertel* zeigten, daß Meerschweinchen durch *intraperitoneale* Infektion kleinster Mengen ($^{1}/_{100\,000\,000}$ ccm Reinkultur) des Bacillus bipolaris septicus, eine gute Virulenz vorausgesetzt, innerhalb von 18—24 Stunden getötet werden. Der Infektionserfolg bei *subcutaner* Verabreichung von Hühnercholerabacillen ist allerdings, worauf schon *Pasteur* aufmerksam gemacht hat, und wie im besonderen *Hertel* nachweisen konnte, recht unsicher. Trotzdem *Hertel* sehr große Mengen der Erreger (0,2—0,5 ccm Reinkultur) subcutan verimpfte, stellte sich nicht immer eine tödliche Sepsis ein. Häufig bildeten sich Abscesse, die wochenlang bestehen blieben, schließlich zur Ausheilung kamen oder nach längerer Zeit doch noch zum Tode führten. *B. Lange* konnte nun gelegentlich seiner Superinfektionsversuche an Meerschweinchen mit Hühnercholera[1]) gleichartige Befunde erheben, es ergab sich aber in späteren Versuchen mit einer offenbar virulenteren Kultur, daß Meerschweinchen *auch nach subcutaner Infektion mit kleinen und kleinsten Bacillenmengen* subakut oder chronisch erkrankten und an Sepsis zugrunde gingen.

Es liegen nun Untersuchungen, die die Empfänglichkeit der verschiedenen Gewebe auf Grund vergleichender Prüfungen mit abgestuften Mengen der Erreger bewerten, bis heute nicht vor. Solche Untersuchun-

[1]) Zeitschr. f. Hyg. **94**, 135. 1921.

gen wären aber doch von nicht geringem Interesse, im besonderen auch im Hinblick auf die Befunde bei der Milzbrandinfektion.

Meine Versuche mit intraperitonealer, intravenöser und subcutaner bzw. intracutaner Infektion ergaben folgendes:

Die *intraperitoneale* Verimpfung einer von einem Fall spontaner Meerschweinchensepticämie stammenden Kultur (Serumbouillon) auf gesunde Tiere von 250—400 g Gewicht hatte nicht immer gleichmäßige Ergebnisse. Es kam vor, daß kleinste, in künstlicher Kultur noch auswachsende Bakterienmengen nicht infizierten, andererseits daß zwar die Infektion mit kleinsten Mengen ($^1/_{100\,000\,000}$ ccm) Erfolg hatte, aber Tiere, die zehn- bis hundertmal größere Dosis erhalten hatten, überlebten. Da ich bei Verimpfung von Organaufschwemmungen und Exsudaten an Hühnercholerasepsis verendeter Meerschweinchen in einigen Versuchen derartige Unregelmäßigkeiten nicht beobachtet habe, vielmehr alle bis zur kleinsten Dosis herab geimpfte Tiere innerhalb von 24 Stunden an Peritonitis und Sepsis starben, nehme ich an, daß infolge der Züchtung auf künstlicher Kultur mehrfach eine leichte Virulenzschwächung der Keime stattgefunden hat. Die Neigung der auch sonst recht veränderlichen Hühnercholerabakterien, in künstlicher Kultur an Virulenz einzubüßen, ist ja bekannt[1]).

Der von mir benutzte Septicämiestamm hatte nun auch vom Unterhautzellgewebe aus eine starke Wirkung. Diese war allerdings, worauf schon *Hertel* hingewiesen hat, abhängig von der Art der Einspritzung und dem Flüssigkeitsvolumen der Aufschwemmung. Z. B. bedingt ein rasches Übergreifen der Infektion von der Subcutis auf die Bauchhöhle, das sich nicht selten ereignet, wenn die Infektion am Bauch vorgenommen wird, eine rasch tödliche Erkrankung. In der Regel wirkte aber die subcutane Verabfolgung der Hühnercholerabakterien schwächer, in keinem Versuch stärker als die intraperitoneale. Die Unterschiede traten nun viel stärker hervor, wenn die Impfung nicht subcutan, sondern *intracutan* gemacht wurde. Auch die intravenöse Infektion erwies sich als weniger gefährlich als die intraperitoneale, manchmal sogar auch als die subcutane. Das Gesagte sei an einigen Beispielen erläutert (Tab. 3).

Es ergibt sich, daß *das Bauchfell die höchste Empfänglichkeit* gegen die Infektion mit Hühnercholerabakterien besitzt, das Blutgefäßsystem und die Haut sind deutlich von geringerer Empfindlichkeit.

Wir haben hier also offenbar *in bezug auf das Verhalten des Hautorgans grundsätzlich andere Verhältnisse als bei der Milzbrandinfektion*, wenn

---

[1]) Daß die auffallende Unregelmäßigkeit nach parenteraler Verimpfung von Kulturen auf einen Mangel an Virulenz zurückzuführen ist, dafür spricht die von *Freund* gemachte Beobachtung, daß die ip. Verimpfung von Stämmen sicher abgeschwächter Virulenz dieses Phänomen ziemlich häufig hervortreten läßt (vgl. die demnächst in dieser Zeitschrift erscheinende Arbeit von *Freund*).

Tabelle 3.

Parenterale Infektion von Meerschweinchen mit dem Bacillus bipolaris septicus.

Nr. des Versuchs	Anzahl der Keime pro 1 ccm Bacillenkultur	Kleinste tödliche Dosis in ccm					
		subcutan bzw. intracutan[1])		intravenös		intraperitoneal	
1	1 000 000	1/10 000	$\dagger_1$	1/10 000	lebt	1/10 000	$\dagger_1$
		1/100 000	lebt			1/1 000 000	$\dagger_2$
2	10 000 000 000	1/1 000 000	$\dagger_5$	1/10 000	$\dagger_3$	1/10 000 000	$\dagger_1$
		1/10 000 000	$\dagger_2$	1/1 000 000	lebt	1/1 000 000 000	lebt
3	100 000 000	1/1 000	lebt	·		1/1 000 000	„
		1/1 000 000	„			1/100 000 000	$\dagger_1$
		1/100 000 000	„				
4	1 000 000	1/1 000	2 M. leben[2])	·		1/1 000 000	$\dagger_1$, $\dagger_5$
		1/100 000	2 M. „				

auch die Empfänglichkeit der Haut der Hühnercholerainfektion gegenüber bei *subcutaner* Verimpfung nach meinen Versuchen lange nicht so gering ist, wie es nach früheren Arbeiten den Anschein hat.

Noch stärker treten die Unterschiede gegenüber dem Milzbrand hervor, wenn wir *die natürlichen Infektionswege* bei Milzbrand und Hühnercholerainfektion in bezug auf ihre Empfänglichkeit miteinander vergleichen. Meine Versuche mit dem bipolaren Septicämiebacillus seien im folgenden mitgeteilt.

Bezüglich der Technik verweise ich auf das im I. Abschnitt Gesagte.

Leider wurden diejenigen meiner Versuche, die während April angestellt waren, durch das Auftreten einer spontanen Stallseuche unter den Meerschweinchen (vorwiegend Pasteurellose) empfindlich gestört. In den Versuchen 3, 4, 7 und 8 der Tabelle 3 war es deshalb nicht immer möglich, mit Sicherheit zu entscheiden, ob die Tiere infolge der künstlichen Impfung oder infolge spontaner Erkrankung eingegangen waren. Als *Todesfälle infolge der Impfung* habe ich in der Tabelle lediglich die von denjenigen Tieren aufgenommen, welche innerhalb der ersten 14 Tage nach der künstlichen Infektion starben, gleichgültig, ob die Eingangspforte eine charakteristische schwere Erkrankung zeigte oder nicht, ferner von Tieren, die später starben, aber doch an der jeweils in Betracht kommenden Eingangspforte ausgedehnte pathologische Veränderungen aufwiesen.

6 Versuche wurden mit der Kultur des obenerwähnten höchst virulenten Stammes, 2 Versuche mit dem Exsudat aus der Bauchhöhle eines nach intraperitonealer Impfung verendeten Meerschweinchens angestellt. Die Kontrolle der Wirkung der Kultur geschah durch peritoneale Infektion mit abgestuften Mengen. Gewichte der Tiere zwischen 250 und 400 g. Weitere Einzelheiten sind aus der Tabelle ersichtlich.

[1]) Versuch 1 und 2 subcutane, Versuch 3 und 4 intracutane Verimpfung.

[2]) 1 M. chronisch infiziert (ausgedehnte Phlegmone der Bauchdecken).

Tabelle 4. *Natürliche Infektion von Meerschweinchen mit Hühnercholera-(Pasteurella-)Bakterien.*

Nr. des Versuchs	Bouillonkultur oder Exsudat	Keimzahl pro 1 ccm	Virulenz bei intraperitonealer Verimpfung	Erfolg der Infektion		
				percutan	per os	per inhalationem
1	Kultur	10 000 000 000	nicht ermitt.; wahrscheinlich max.	$^1/_{10}$ ccm 4 : 3 (†$_{11}$)	$^1/_2$ ccm 4 : 3 (†$_4$)	—
2	Kultur	1 000 000 000	$^1/_{1\,000\,000\,000}$ ccm †$_1$ (max.)	$^1/_5$ ccm (N) 2 : 0 (†$_{25}$, †$_4$) $^1/_5$ ccm (B) 2 : 1 (†$_{12}$)	$^1/_{[illegible]}$ ccm 4 : 1 (†$_2$, †$_7$, †$_9$)	655 360 Keime 4 : 1 (†$_3$, †$_{11}$, †$_{14}$)
3	Kultur	10 000 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ ccm †$_1$ $^1/_{1\,000\,000\,000}$ ccm lebt	$^1/_5$ „ (N) 2 : 2 $^1/_{50}$ „ (N) 4 : 4	$^1/_2$ ccm 2 : 2 $^1/_{100}$ „ 4 : 4	163 840 Keime 4 : 3 (†$_4$)
4	Kultur	100 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ ccm †$_1$ (max.)	$^1/_{100}$ „ (N) 4 : 4 $^1/_{10\,000}$ ccm (N) 4 : 4	$^1/_{10\,000}$ ccm 4 : 4 $^1/_{1\,000\,000}$ ccm 4 : 4	10 240 Keime 4 : 3 (†$_1$)
5	Kultur	10 000 000	$^1/_{100\,000}$ ccm †$_1$ $^1/_{10\,000\,000}$ ccm lebt	—	—	2 560 Keime 4 : 4
6	Kultur	100 000 000	$^1/_{1\,000\,000}$ ccm †$_1$ $^1/_{100\,000\,000}$ ccm lebt	—	—	2 560 Keime 4 : 3 (†$_2$) 40 960 Keime 4 : 2 (†$_7$, †$_7$)
7	Exsudat (Bauchhöhle)	10 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ ccm †$_1$ →	$^1/_{10}$ ccm (B) 2 : 1 (†$_6$) $^1/_{100}$ „ (B) 2 : 2	$^1/_{10}$ ccm 2 : 2 $^1/_{100}$ „ 2 : 2	—
8	Exsudat (Bauchhöhle)	10 000 000 000	$^1/_{1\,000\,000\,000}$ ccm †$_1$ $^1/_{100\,000\,000\,000}$ ccm lebt (wahrsch. max.)	$^1/_5$ „ (N) 4 : 1 (†$_3$, †$_{11}$, †$_{15}$)	$^1/_2$ „ 4 : 2 (†$_9$, †$_{15}$)	163 840 Keime 4 : 0 (†$_2$, †$_2$, †$_3$, †$_6$)

(B) = Einreibung in die Haut des Bauches, (N) in die Nackengegend. → heißt Grenze nicht erreicht.

Die Tabelle läßt erkennen, daß die Infektion auf allen Wegen nur dann Erfolg hat, wenn große Keimmengen verwendet werden. Am stärksten ist die Wirkung der Erreger bei Inhalation. Über 100 000 Keime haben aber auch von den Lungen aus noch keinen regelmäßigen Erfolg, immerhin starben bei einer Dosis von 100 000—650 000 Keimen 8 von 12 Tieren. Die kleinste von den Lungen aus wirksame Dosis scheint bei etwa 2000 Keimen zu liegen. Wesentlich schlechter ist der Infektionserfolg bei percutaner und oraler Applikation, was durchaus mit den Erfahrungen von *Kolle*, *Fritsche*, *Katz*, *Voges*, *Hertel* u. a. übereinstimmt. Die Infektion gelingt manchmal selbst nicht mit ungeheuren Mengen der Erreger z. B. $^1/_2$—$^1/_5$ ccm R. K. = 5—2 Milliarden Keime. Schon $^1/_{100}$ ccm R. K. = etwa 10 Millionen Keime waren, sowohl verfüttert wie auch auf die Haut eingerieben, ganz unwirksam. Bei den mit Erfolg infizierten Cutantieren (Versuch 1, 2, 7 und 8) war der Verlauf der Krankheit ähnlich wie nach subcutaner Infektion; die Tiere starben zuweilen erst nach 11—25 Tagen. Auch die Krankheit der per os infizierten Meerschweinchen führte mehrfach erst nach 7—15 Tagen zum Tode. Wenn bei der Inhalationsinfektion auch die meisten akuten Krankheitsformen vorkamen, so begegnen wir doch auch hier einer Krankheitsdauer von 1—2 Wochen.

Im Versuch 5 der Tabelle wurden zur Kontrolle nicht nur sofort nach der Inhalation, sondern auch 48 Stunden danach je zwei Meerschweinchen, die zusammen mit 4 in der Tabelle angeführten dem Inhalationsspray ausgesetzt waren, getötet und mit den Lungenverreibungen dieser Tiere Kulturen angelegt. Nach dem Befund des sofort getöteten Tieres waren 2560 Keime in die Lungen inhaliert. In den Lungen zweier nach 48 Stunden getöteter Meerschweinchen *konnten nun Hühnercholerabakterien nicht mehr nachgewiesen werden*, die inhalierten Keime sind also innerhalb von 2 Tagen sämtlich von den Lungen vernichtet bzw. so stark geschädigt worden, daß sie durch künstliche Kultur nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Übrigens wurde auch ein Eindringen von Hühnercholerabakterien *ins Blut* gleich nach ihrem Eindringen in die Lungen nicht beobachtet.

Die Versuche sprechen dafür, daß Haut und Schleimhäute einschließlich der Lungen gesunder Meerschweinchen bipolaren Septicämieerregern höchster Virulenz gegenüber *starke Abwehrkräfte* entfalten, die nur dann versagen, wenn die Zahl der angreifenden Bakterien eine ungewöhnlich große ist, aber auch in diesem Falle vielfach *protrahierte* Erkrankungen bedingen.

Was die pathologisch-anatomischen Befunde bei den infolge der Infektion verendeten Tieren der Tab. 4 betrifft, so fehlten bei den percutan infizierten Tieren stärkere Entzündungserscheinungen der Haut und Subcutis nur selten, häufig waren sie hochgradig. Es fanden sich alle Übergänge zwischen leichteren

Graden der Entzündung und schwersten, mit ausgedehnter Gewebsnekrose einhergehenden Veränderungen. Bald handelte es sich mehr um lokale Abscedierungen, bald um diffuse hämorrhagisch-fibrinöse Entzündungen im Unterhautzellgewebe. Bei den nach oraler Infektion verendeten Tieren wies in der Regel der Darm, und zwar meist in ganzer Ausdehnung eine dunkelrote Farbe auf, die Schleimhaut war geschwollen, saftig und von Blutungen durchsetzt. Auch die Halsdrüsen und in einem Falle die Mesenterialdrüsen zeigten starke Schwellung, auch mehr oder weniger fortgeschrittene Vereiterung oder Blutungen. Bei den Inhalationstieren stand die Pneumonie, mehrfach mit fibrinös-eitriger Pleuritis verbunden, im Vordergrund. Die Pneumonie hatte einigemal einen oder mehrere Lappen in ganzer Ausdehnung ergriffen, in anderen Fällen bestanden multiple bronchopneumonische Herde. Die Trachealdrüsen waren meist geschwollen, in einem Fall auch in starkem Grade die Submental-, oberflächlichen und tiefen Cervicaldrüsen.

Es muß aber betont werden, daß alle diese Veränderungen nicht als pathognomonisch für eine bestimmte Infektionsart angesehen werden können. Im besonderen fand sich eine Pneumonie, die von derjenigen der Inhalationstiere nicht zu unterscheiden ist, mehrfach, wenn auch nicht so häufig, bei percutan und oral infizierten Tieren.

III. *Versuche mit Paratyphus-B-Bakterien.*

Die Versuche wurden angestellt mit einer Kultur, die aus einem Fall spontaner Paratyphussepsis eines Meerschweinchens gewonnen war und hohe Virulenz besaß. In zwei Versuchen, der eine mit 24stündiger Agarkultur, der zweite mit Exsudat aus der Bauchhöhle eines an Paratyphus verendeten Meerschweinchens, wurde der Erfolg der intraperitonealen, subcutanen und intravenösen Infektion vergleichend geprüft. (Tabelle 5.)

Tabelle 5.

Parenterale Infektion von Meerschweinchen mit dem Paratyphus-B-Bacillus.

Nr. des Versuchs	Anzahl der Keime pro Öse bzw. 1 ccm	Kleinste tödliche Dosis in Öse bzw. ccm					
		subcutan		intravenös		intraperitoneal	
1	1 000 000 000	1/10 000	lebt	1/10 000	$\dagger_{6}$	1/10 000	$\dagger_{2}$
		1/1 000 000	„	1/1 000 000	lebt	1/1 000 000	$\dagger_{11}$
		1/100 000 000	„	1/100 000 000	„	1/100 000 000	$\dagger_{10}$
2	1 000 000 000	1/100 000	$\dagger_{5}$	1/100 000	$\dagger_{12}$	1/100 000	$\dagger_{7}$
		1/10 000 000	$\dagger_{3}$	1/10 000 000	lebt	1/10 000 000	$\dagger_{2}$
		1/1 000 000 000	$\dagger_{15}$	1/1 000 000 000	$\dagger_{27}$	1/1 000 000 000	$\dagger_{3}$

Der Versuch 1 ist mit 24stündiger Agarkultur, Versuch 2 mit „tierischen" Bacillen (Exsudat) angestellt.

Da der Tod der beiden mit ein Milliardstel ccm subcutan und intravenös geimpften Tiere im Versuch 2 in eine Zeit hineinfällt, in der eine besondere *Disposition* der Tiere zu septischen Erkrankungen bestand (April 1925), ist es vielleicht nur *infolge der herabgesetzten Resistenz der Tiere zu einer tödlichen* Infektion gekommen. Beide Versuche zeigen, daß *das Bauchfell eine höhere Empfänglichkeit für die Infektion besitzt als*

das Blutgefäßsystem, die subcutane Verimpfung wirkte nur im Versuch 1 deutlich schlechter als die intraperitoneale, im Versuch 2 annähernd gleich.

Das Ergebnis hat eine gewisse Ähnlichkeit mit dem bei der Hühnercholerainfektion erzielten. Die Empfänglichkeit der Haut und besonders des Bauchfells der *Milzbrandinfektion* gegenüber ist eine grundsätzlich andere. Für alle drei Erreger zeigt das Blutgefäßsystem eine relativ geringe Empfänglichkeit. Wie bei Infektionen mit dem Bacillus bipolaris septicus treten die bezeichneten Unterschiede in der Empfänglichkeit der verschiedenen Gewebe den Erregern gegenüber auch beim Paratyphus um so mehr zurück, je höher die Virulenz der Kultur ist.

Tabelle 6. *Natürliche Infektion von Meerschweinchen mit Paratyphus-B-Bakterien.*

Nr. des Vers.	Agarkultur oder Exsudat?	Keimzahl pro 1 Öse bzw. 1 ccm	Virulenz bei intraperitonealer Verimpfung	Erfolg der Infektion		
				percutan	per os	per inhalation
1	Kultur	100 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ Öse †$_4$ (max.)	$^1/_{10}$ Öse 4 : 4 $^1/_{100}$ „ 4 : 4	$^1/_2$ Öse 4 : 4 $^1/_{10}$ „ 4 : 4	·
2	Kultur	1 000 000 000	$^1/_{10\,000\,000}$ Öse †$_1$ $^1/_{100\,000\,000}$ „ lebt	·	·	163 840 Keime 4 : 4
3	Kultur	1 000 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ „ †$_3$ → (wahrsch. max.)	·	·	163 840 Keime 4 : 4
4	Exsudat (Bauchhöhle)	1 000 000 000	$^1/_{1\,000\,000\,000}$ ccm †$_{15}$ (max.)	$^1/_{10}$ ccm 2 : 2 $^1/_{1000}$ „ 2 : 2	$^1/_{10}$ ccm 2 : 1 (†$_{25}$)[1] $^1/_{1000}$ ccm 2 : 2	·
5	Exsudat (Bauchhöhle)	100 000 000	$^1/_{100\,000\,000}$ ccm †$_{10}$ (max.)	$^1/_{10}$ „ 4 : 4	$^1/_2$ ccm 2 : 2 $^1/_{10}$ „ 2 : 2	·

Der Erfolg der Infektion *auf den natürlichen Wegen* ist, wie die Tab. 5 zeigt, ein auffallend schlechter. Nur einmal starb ein Meerschweinchen, und zwar 25 Tage nach oraler Infektion mit $^1/_{10}$ ccm = 2 Tropfen Reinkultur = 1 000 000 000 Keimen an schwerer Enteritis und Paratyphussepsis. Bei diesem Tier ist es zudem noch zweifelhaft, ob hier nicht eine Spontaninfektion bei herabgesetzter Resistenz des Organismus vorliegt, denn der Tod fällt in eine Zeit hinein, in der Stallseuchen herrschten und — wenn auch in geringer Häufung — spontane Erkrankungen der Meerschweinchen an Paratyphus beobachtet wurden. Die percutane und Inhalationsinfektion hatte ein ganz negatives Ergebnis trotz Verwendung großer Bakterienmengen höchster Virulenz. Die Tiere blieben vollkommen gesund. Wahrscheinlich hätten Versuche mit weiterer Steigerung der Dosis doch hie und da auf den geprüften Wegen zu Erkrankung geführt. Ich möchte dies folgern aus den Versuchen von *Kutscher* und *Meinicke* wie aus den Versuchen von *Ornstein*, aus denen hervor-

[1]) Möglicherweise Spontaninfektion.

geht, daß die Verfütterung sehr großer Mengen von Paratyphus-B-Bakterien (z. B. Mäusetyphusbakterien) unter Umständen Erkrankung und Tod der Tiere zur Folge hat. Die Todesfälle nach Verfütterung von Mäusetyphusbacillen, die *Ornstein* beobachtete, sind allerdings im Hinblick auf die enorme Menge der verfütterten Bakterien ($^1/_2$ Kolle-Schale 24stündiger Kultur) wohl als *Giftwirkung* aufzufassen.

Die Zahl meiner Versuche ist gering, trotzdem berechtigen sie zu der Annahme einer hohen Resistenz der Haut, der Schleimhäute des Verdauungstraktus und der Lungen gegen natürliche Infektion mit Paratyphusbacillen. Die Ergebnisse stimmen übrigens gut überein mit den Beobachtungen, welche andere Autoren früher mit der Infektion auf den natürlichen Wegen bei Meerschweinchen und größeren Versuchstieren gemacht haben.

IV. Versuche mit Pneumokokken.

Gelegentlich einer vor 2 Jahren im Institut auftretenden Stallseuche der Meerschweinchen wurden aus an Pneumokokkensepsis verendeten Tieren 3 Pneumokokkenstämme isoliert und mit Kulturen dieser Stämme Infektionsversuche an Meerschweinchen angestellt.

In bezug auf die Wirkung bei parenteraler Verimpfung verhielten sich die Stämme annähernd gleich. Es gelang die Infektion mit mittleren und kleinen Keimmengen ($^1/_{1000}$—$^1/_{1\,000\,000}$ ccm Reinkultur) sowohl von der Subcutis wie von der Bauchhöhle aus in mehreren Versuchen nur ausnahmsweise. Sicheren Erfolg hatten nicht einmal sehr große Keimmengen ($^1/_{10}$—1 ccm Kultur). Die intraperitoneale Impfung scheint nicht wirksamer zu sein als die subcutane und intravenöse, doch kann wegen der kleinen Zahl der einschlägigen Versuche hierüber ein endgültiges Urteil nicht abgegeben werden. Auch die zu späterer Zeit ausgeführte Verimpfung pneumokokkenhaltiger Organaufschwemmungen (Lungen, Milz) wirkte unregelmäßig, selbst wenn große Keimmengen ($^1/_{10}$—$^1/_{100}$ ccm entsprechend 10—1 Millionen Keime) zur Anwendung kamen.

Der schlechten Wirkung von Kultur und „tierischen" Pneumokokken entsprach der negative Erfolg bei Verimpfung auf den natürlichen Wegen. In drei Versuchen wurden Reinkulturen verspravt. Dabei atmeten im ganzen 12 Meerschweinchen nachweislich mehrere hunderttausend Keime in die Lungen ein. Sie blieben sämtlich gesund. In zwei Versuchen wurden im ganzen 8 Meerschweinchen je 2 Tropfen Reinkultur auf die Haut eingerieben, an weitere 8 Tiere dieselben Mengen verfüttert — mit dem gleichen negativen Resultat. Auch die Einreibung von je 2 Tropfen pneumokokkenhaltiger Milzaufschwemmung in die Haut bei 4 Tieren und Verfütterung der gleichen Menge der Aufschwemmung (1 000 000 Pneumokokken) an vier weitere Tiere war erfolglos. Ebenso verlief ein Versuch mit Einträufelung von 2 Tropfen Reinkultur in den Bindehautsack.

V. Versuche mit Tuberkelbacillen.

Zum Vergleich mit den oben beschriebenen Infektionen des Meerschweinchens mit verschiedenen Erregern scheint mir die Tuberkuloseinfektion deswegen ganz besonders geeignet, weil nach den zahlreichen über diesen Gegenstand vorliegenden Experimenten eine Vorstellung über die Empfänglichkeit wenigstens von Verdauungstraktus und Lungen unschwer zu gewinnen ist. Allerdings fehlen, soviel ich sehe, exakte quantitativ vergleichende Untersuchungen mit *parenteraler* Infektion von der Haut, der Bauchhöhle und dem Blutgefäßsystem aus, offenbar weil man bei der großen allgemeinen Empfänglichkeit des Meerschweinchens für Tuberkulose Unterschiede in der Empfänglichkeit der einzelnen Organsysteme bei dieser Art der Impfung nicht erwartet hat. Ich habe deshalb zunächst einige Versuche in dieser Richtung angestellt. In drei größeren Versuchsreihen wurden mehrere Meerschweinchen mit den gleichen abgestuften, an der Grenze der Wirksamkeit stehenden Dosen, nämlich 1 Millionstel bis 1 Hundertmillionstel mg der bovinen Kultur G. A. intravenös, intraperitoneal, subcutan und teilweise intracutan infiziert[1]) und, soweit sie nicht interkurrent starben, nach 5—8 Wochen getötet und der anatomische Befund gleichzeitig getöteter, mit derselben Dosis auf den verschiedenen Wegen infizierter Tiere miteinander verglichen. Es zeigte sich nun, daß kleinste Bacillenmengen (1—10 Bacillen) sowohl vom Blutwege wie vom Peritoneum und von der Haut aus noch regelmäßig infizierten. Die Erkrankung war bei den iv. und ip. geimpften Tieren ca. 6 Wochen nach der Impfung etwas weiter fortgeschritten als bei den Subcutantieren. *Die Intracutaninfektion erwies sich als die mildeste.* Bei einer größeren Zahl von Meerschweinchen, die mit 1 Millionstel mg intravenös, intraperitoneal und intracutan infiziert, aber erst nach ca. 4 Monaten getötet wurden, konnten allerdings deutliche Unterschiede im Grade der Erkrankung je nach der Impfart nicht mehr festgestellt werden. Doch war die Dosis vielleicht noch zu groß, um solche Unterschiede hervortreten zu lassen. Die Versuche, die noch zu einem anderen Zweck, nämlich zum Studium der experimentellen Lungentuberkulose des Meerschweinchens nach parenteraler Infektion angestellt wurden, sind z. Z. noch nicht abgeschlossen. Es wird gelegentlich über sie berichtet werden.

Während nun bei den nach 5—8 Wochen getöteten Tieren, die mit kleinsten Mengen Bacillen ($^1/_{10\,000\,000}$—$^1/_{100\,000\,000}$ mg) iv. ip. oder sc. geimpft waren, die Milz sich vielfach nur in sehr geringem Grade vergrößert erwies, zeigten Tiere, welche einzelne wenige Bacillen des auch von mir benutzten Stammes G. A. *inhaliert* hatten, nach den Proto-

[1]) Die intravenöse und intraperitoneale Infektion geschah unter Beachtung der im Abschnitt I (Milzbrand) angegebenen Kautelen.

kollen von *B. Lange* und *Nowosselsky* nicht so selten schon nach 5—6 Wochen eine deutliche Milzschwellung, auch in der Regel stärkere Verkäsung der Lymphdrüsen an der Eingangspforte. Ich schließe daraus und aus dem regelmäßigen Erfolg kleinster Bacillenmengen bei Inhalation, *daß die natürliche, aerogene Lungeninfektion an Gefährlichkeit der künstlichen intraperitonealen, intravenösen, subcutanen, intracutanen Infektion mindestens nicht nachsteht.*

Ganz anders liegen die Dinge nun offenbar für zwei andere, neben den Lungen für die natürliche Infektion in Betracht kommende Organsysteme, nämlich die *Haut* und die Schleimhäute des Verdauungstraktus.

Die in der Literatur vorhandenen Beobachtungen über percutane Infektion des Meerschweinchens mit Tuberkelbacillen beziehen sich ausschließlich auf sehr große Keimmengen. Diese großen Mengen hatten bei percutaner Applikation fast regelmäßig Erfolg. Die Einreibung tuberkelbacillenhaltigen Sputums und Organbreis führte aber *häufig nicht zur Infektion* (Näheres in der Arbeit von *Koenigsfeld*). Hiernach besitzt die Haut anscheinend eine ziemlich große Widerstandsfähigkeit der Tuberkuloseinfektion gegenüber.

Ich selbst habe in einem Versuch Meerschweinchen percutan mit 2 Tropfen einer Aufschwemmung von Tuberkelbacillen (Stamm G. A.) in Kochsalzlösung infiziert. Während 4 Tieren 2 Tropfen = $^{1}/_{10}$ mg Kulturmasse eingerieben wurden, erhielten 4 andere $^{1}/_{1000}$ mg in der gleichen Flüssigkeitsmenge auf die Haut. Eine Infektion trat nur bei den 4 Tieren der ersten Serie ein, die 4 Meerschweinchen der zweiten Serie blieben gesund. Der Versuch wurde später unter den gleichen Versuchsbedingungen mit dem gleichen Erfolg wiederholt. Die Kultur erwies sich bei parenteraler Verimpfung stets als maximal virulent.

Es scheint demnach die unverletzte Haut für die Tuberkuloseinfektion nur wenig empfänglich zu sein.

Was die *orale* Infektion bei Meerschweinchen betrifft, so sei auf die Experimente von *B. Lange* verwiesen[1]). Aus diesen Versuchen, die vielfach mit dem gleichen Stamm boviner Bacillen G. A. angestellt worden sind, hat sich ergeben, daß per os nur sehr große Dosen (1 Öse) regelmäßig zur Erkrankung führen, daß aber gelegentlich die Infektion noch mit sehr kleinen Bacillenmengen gelingt. Ich lasse es dahingestellt, ob nicht eine größere Zahl von Percutanversuchen mit kleineren Bacillenmengen auch hie und da ein positives Ergebnis gezeitigt hätte.

So viel ist jedenfalls sicher: Die Empfänglichkeit der Haut und der Schleimhäute des Verdauungstraktus *steht derjenigen der Lungen erheblich nach.*

---

[1]) Zeitschr. f. Hyg. **103.** 1. 1924.

Besprechung der Gesamtergebnisse.

Meine Untersuchungen an Meerschweinchen hatten in erster Linie zum Ziel, das Verhalten der als Eingangspforten in Betracht kommenden Organsysteme *gegenüber der natürlichen Infektion* mit verschiedenen pathogenen Keimen zu prüfen. Für einige Erreger habe ich nun, ausgehend von den Erfahrungen *Besredkas* bei Milzbrand, auch die *parenterale Infektion* untersucht und dabei festgestellt, daß selbst bei dieser gewaltsamen Art der Infektion doch grundsätzliche Unterschiede in der Resistenz der Körpergewebe zutage treten, wenn man nur die Infektion mit kleinsten, an der Grenze der Wirksamkeit stehenden Bakterienmengen ausführt.

Milzbrandbacillen von augenscheinlich höchster Virulenz wirken regelmäßig in kleinsten Mengen (ca. 1—10 Bacillen) nur bei subcutaner Verimpfung, zur Infektion von der Bauchhöhle und vom Blutwege aus wurden durchweg größere Keimmengen benötigt. Ganz anders verhalten sich die Gewebe der Hühnercholera- und Paratyphus-B-Infektion gegenüber. Für diese Septicämieerreger ist das Bauchfell von höchster Empfindlichkeit, die Haut nur Paratyphusbacillen gegenüber annähernd gleich empfindlich, gegen Hühnercholera von deutlich geringerer Empfindlichkeit. Das Blutgefäßsystem zeigte sowohl für Milzbrandbacillen wie für Hühnercholera- und Paratyphus-B-Bakterien keine maximale Empfänglichkeit; auf dem Blutwege injizierte kleinste Mengen der Erreger waren oft unwirksam, während dieselben Mengen, ja zehnfach und hundertfach kleinere von der Haut bzw. vom Bauchfell aus noch infizierten. Es scheint allerdings, als ob die Unterschiede in der Empfänglichkeit der verschiedenen Gewebe sich bis zu einem gewissen Grade ausgleichen, wenn die Infektion durch Bakterien geschieht, welche wie z. B. häufig „tierische" Bakterien noch über eine ungeschwächte höchste Virulenz verfügen. Umgekehrt wird bei Kulturen von sehr abgeschwächter Virulenz beobachtet werden können, daß die Infektion nur von dem empfänglichsten Gewebe aus gelingt, nicht dagegen von anderen Organen. Ein solcher Fall mag Beobachtungen wie denen von *Besredka* zugrunde liegen.

Der Tuberkelbacillus ist für alle drei Wege von höchster Invasionsfähigkeit. Von den drei geprüften Organsystemen scheint nur die Haut über gewisse schwache Abwehrkräfte der parenteralen Infektion gegenüber zu verfügen: Zwar gelingt die Infektion mit dem von mir geprüften bovinen Stamm von der Haut aus augenscheinlich noch mit einzelnen wenigen Bacillen mit großer Sicherheit, der Verlauf der Erkrankung ist aber milder als bei der Infektion vom Peritoneum und vom Blutwege aus.

Pneumokokken infizierten auf allen drei Wegen (sc., ip. und iv.) schlecht.

Hiernach besteht ohne Frage *eine Affinität der Erreger zu bestimmten Körpergeweben*, was mit den epidemiologischen und experimentellen Erfahrungen anderer Autoren gut übereinstimmt.

Für die Maus habe ich vergleichende Infektionen auf parenteralem Wege nur mit Milzbrand vorgenommen. Für die Infektion mit Mäusetyphus-, Hühnercholerabakterien, Streptokokken und Pneumokokken scheint nach früheren Beobachtungen von *B. Lange* das Bauchfell empfänglicher zu sein als die Haut, für die Rotlaufinfektion ist eher das Umgekehrte anzunehmen.

Zur endgültigen Klärung der Frage müßten aber weitere Versuche, im besonderen auch unter Heranziehung der intravenösen Impfung angestellt werden. Klar liegen die Verhältnisse aber für die *Milzbrandinfektion* der Maus unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen (vgl. II. Mittlg.). Hier zeigt sich nun überraschenderweise ein deutlicher Unterschied im Verhalten von Maus und Meerschweinchen. Bei der Maus tritt nämlich in gewisser Hinsicht, am deutlichsten bei Verwendung höchst virulenter „tierischer" Bacillen, eine *mindestens gleiche, wenn nicht stärkere Empfänglichkeit des Blutweges und des Bauchfells gegenüber der Haut* hervor: Sporen infizieren zwar in der Regel noch mit kleineren Mengen bei subcutaner Verimpfung als bei intravenöser und peritonealer, aber sowohl bei Verimpfung sporenhaltiger wie sporenfreier Milzbrandbacillen starben die iv. und ip. infizierten Mäuse schneller als die subcutan infizierten. Beim Meerschweinchen dagegen ist *die Haut stets von höherer Empfänglichkeit*, ganz gleich ob man Kulturbacillen oder Organaufschwemmungen, Sporen oder sporenfreie Bacillen zur Infektion verwendet. Den *Mechanismus*, der der *natürlichen Resistenz der tierischen Gewebe* gegenüber einer Infektion zugrunde liegt, näher aufzuklären, muß weiteren Forschungen überlassen bleiben. Sie heute schon nach einer bestimmten Richtung hin zu deuten, erscheint mir nicht möglich.

Was nun die *Infektion auf den natürlichen Wegen* betrifft, so haben sich für das Meerschweinchen Tatsachen ergeben, die im großen und ganzen den Erfahrungen entsprechen, die *B. Lange* und seine Mitarbeiter, auch ich selbst (vgl. I. Mittlg.) an der Maus gewonnen haben.

Bezüglich der Milzbrandinfektion kann es hiernach keinem Zweifel unterliegen, daß die natürliche Infektion von Mäusen und Meerschweinchen durch Einatmung sporenhaltiger Erreger, mindestens bei der Maus auch durch Verfütterung von Sporen gelingt, unter Bedingungen also, die das gleichzeitige Zustandekommen einer Hautinfektion sicher ausschließen. Wenn hiernach auch die Anschauung *Besredkas*, die Haut sei das einzige für die Milzbrandinfektion empfängliche Organ, erneut widerlegt ist, so konnte doch andererseits im Sinne *Besredkas eine Empfänglichkeit der Haut für die Infektion mit Sporen wie mit Bacillen*

nachgewiesen werden, wie sie bei der Maus und beim Meerschweinchen gegenüber anderen Erregern auch nicht annähernd in diesem Grade erreicht wird.

Durchweg erscheint nun in meinen Versuchen mit *Infektion auf den natürlichen Wegen der Infektionserfolg erheblich schlechter als derjenige der parenteralen Infektion.* Auch dort, wo die Infektion angeht, ist vielfach der Verlauf der Krankheit ein subakuter bzw. chronischer (Hühnercholera percutan und per os). Es hängt dies damit zusammen, daß bei der parenteralen Infektion *die wichtigsten natürlichen Schutzmittel des Körpers im ersten Anlauf überrannt werden, während bei der natürlichen Infektion das Spiel der Abwehrkräfte sich voll entfalten kann.*

Das Unregelmäßige der Resultate der natürlichen Infektion beruht teilweise auf Zufälligkeiten, teilweise aber spielen hier sicher *individuelle Resistenzunterschiede* der geimpften Tiere mit, wie wir solche in unseren Versuchen auch an Mäusen vielfach angetroffen haben.

Aus den über die Inhalationsinfektion des Meerschweinchens mit Tuberkelbacillen vorliegenden Beobachtungen können wir schließen, daß die Lungen des Meerschweinchens gegenüber dem Tuberkelbacillus offenbar über das geringste Maß an Abwehrkräften verfügen. Bei der Einreibung von Milzbrandbacillen auf die Haut machen sich schon gewisse, wenn auch recht unvollkommene Abwehrkräfte geltend. Einerseits bleibt augenscheinlich ein großer Teil der auf die Haut gebrachten Keime auf derselben liegen, unfähig, sie zu durchdringen, und wird später mit Sekreten und Hautschuppen abgestoßen, andererseits geht aber auch wohl von den in die Haut eindringenden Keimen ein gewisser Anteil zugrunde oder wird in seiner Entwicklung gehemmt. Es wäre sonst kaum zu erklären, warum die kleinste eben wirksame Dosis noch so groß ist, wie ich sie festgestellt habe (zwischen $^1/_{1000}$ und $^1/_{100\,000}$ Öse!).

Die *kräftigste bakterienfeindliche Wirkung der lebenden Gewebe*, und zwar aller Eingangspforten fast gleichmäßig, trat bei der Infektion mit Pneumokokken und Paratyphus-B-Bacillen hervor; dabei waren wenigstens die letzteren ip. maximal virulent.

Wenn ich in der folgenden Tabelle eine kurze Übersicht gebe über das Verhalten der Eingangspforten, Haut, Verdauungstraktus und Lungen, gegen die geprüften Infektionserreger, so bin ich mir wohl der Schwierigkeit bewußt, aus den vorliegenden Resultaten zu einem genauen Urteil zu gelangen. Mag man aber auch immer im Zweifel sein, ob die einzelnen Bezeichnungen für die Empfänglichkeit richtig gegeneinander abgeschätzt sind, es kommt hier ja doch hauptsächlich auf die ins Auge fallenden groben Unterschiede, nicht auf feinere Abstufungen an. In die Tabelle habe ich die Werte mit aufgenommen, wie sie von *B. Lange*, *Keschischian*, *Nowosselsky* und mir *für die Maus* und für eine Reihe von Erregern ermittelt worden sind.

Tabelle 7. *Die Empfänglichkeit von Haut, Verdauungstraktus und Lungen des Meerschweinchens und der Maus verschiedenen Infektionserregern gegenüber bei natürlicher Infektion.*

Geprüfte Bakterienart	Tierart	Haut	Verdauungstraktus	Lungen
Milzbrand	Meerschw.	*hoch*	auffallend gering	mittleren Grades
	Maus	*hoch*	sehr gering	*hoch*
Bac. bipolaris septicus	Meerschw.	gering	sehr gering	mittleren Grades
	Maus	gering	mittleren Grades	*sehr hoch*
Bac. Paratyphi B	Meerschw.	auffall. gering	sehr gering	sehr gering
	Maus	zweifelhaft (viell. hoch)	*hoch*	*sehr hoch*
Pneumokokken	Meerschw.	auffall. gering	auffallend gering	auffallend gering
	Maus	gering	gering	gering
Tuberkelbacillen	Meerschw.	gering	mittleren Grades	*sehr hoch*
Rotlaufbacillen	Maus	gering [1])	sehr gering	mittleren Grades
Streptokokken	Maus	gering	sehr gering	mittleren Grades

Es ergeben sich, wie die Tabelle zeigt, in bezug auf die Empfänglichkeit der als Eintrittspforten der natürlichen Infektion in Betracht kommenden Organe entsprechend den verschiedenen Infektionserregern wichtige Unterschiede. Wir beobachten wie bei der parenteralen Infektion so bei der Infektion auf den natürlichen Wegen eine *elektive Empfänglichkeit gewisser Organe für bestimmte Erreger, z. B. der Haut* des Meerschweinchens und der Maus *für den Milzbrandbacillus, der Lungen* des Meerschweinchens *für den Tuberkelbacillus,* der Lungen der Maus für den Bacillus bipolaris septicus und den Paratyphus-B-Bacillus (Mäusetyphusbacillus).

Wir fanden bei der Maus für verschiedene Infektionserreger im allgemeinen eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung der geprüften Kulturen bzw. Organaufschwemmungen von ihrer durch Kontrollversuche ermittelten *Virulenz auf parenteralem Wege.* Diese Abhängigkeit tritt in meinen oben mitgeteilten Versuchen wohl hauptsächlich deswegen nicht hervor, weil überwiegend Kulturen sehr hoher Virulenz verwendet wurden. Vergleichen wir die einzelnen Erreger miteinander, so ist bei den Pneumokokken ein Parallelismus zwischen dem Erfolg der künstlichen und der natürlichen Infektion insofern vorhanden, als hier der mangelhaften Virulenz auf parenteralem Wege gänzlich negative Resultate bei natürlicher Infektion entsprechen.

Von nicht geringer Wichtigkeit scheinen mir Untersuchungen wie die meinen für die Erforschung der natürlichen Verbreitungsweise der

[1]) In früheren Versuchen von *B. Lange* mittleren Grades.

Infektionskrankheiten. Es geht nicht an, wie dies auch heute noch vielfach geschieht, lediglich aus der im Experiment festgestellten *Möglichkeit einer Infektion auf einem bestimmten Wege den Schluß zu ziehen, daß dieser Infektionsweg auch in der Praxis eine Rolle spielt.* Zur Beurteilung dieser Frage sind Versuche, Tiere von den verschiedenen Eintrittspforten mit in weiten Grenzen abgestuften Mengen der Erreger zu infizieren, unerläßlich. Entscheidend für die Verhältnisse in der Praxis ist allerdings neben derartigen Feststellungen die Kenntnis der *Gelegenheit zur Infektion* auf den verschiedenen Wegen unter natürlichen Bedingungen. Es ist durchaus der Fall denkbar, daß das am wenigsten empfängliche Organ in der Praxis häufig primär von außen infiziert wird, weil eben die Gelegenheit zur Infektion dieses Organs mit größeren Keimmengen unter natürlichen Bedingungen besonders häufig gegeben ist. Hierauf kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden, es sei nur darauf hingewiesen, welche grundlegende Bedeutung für unsere Anschauung von der Verbreitung der Tuberkulose die exakten quantitativ vergleichenden Untersuchungen von *Reichenbach*, *Findel*, *Weber* und *Titze* u. a.[1]) über Inhalations- und Fütterungstuberkulose bei Tieren gewonnen haben. Die hohe Empfänglichkeit der Lungen für den Tuberkelbacillus läßt darauf schließen, daß Tiere mit derartig hoher Empfänglichkeit der Lungen leicht spontan infolge primärer aerogener Infektion der Lungen an Tuberkulose erkranken, wenn nur Gelegenheit zur Einatmung in der Luft suspendierter Bacillen unter natürlichen Bedingungen gegeben ist. Dieser Schluß ist in der Tat richtig, wie sich im besonderen aus den neuesten Untersuchungen von *B. Lange* über Staubinfektion ergeben hat. *Lange* konnte u. a. bei Meerschweinchen, denen das Fell mit kleinen Mengen bacillenhaltigen menschlichen Sputums bestrichen wurde, trotzdem diese Manipulation nur ein einziges Mal geschah und die Tiere teilweise in großen luftigen Käfigen untergebracht waren, in einem nicht geringen Prozentsatz der Fälle primäre Inhalationstuberkulose der Lungen bei den der Infektion exponierten Meerschweinchen feststellen[2]).

Zu ganz anderen Schlüssen kommen wir aber bezüglich einiger anderer bei Tieren spontan auftretender Infektionskrankheiten, nämlich der durch Pneumokokken, den Bacillus bipolaris septicus und durch Paratyphusbacillen verursachten septicämischen Erkrankungen. Wenn wir berücksichtigen, wie schwer die Infektion mit diesen Erregern auf den natürlichen Wegen gelingt, selbst dann, wenn Erreger in tierischen Organen auf gesunde Meerschweinchen verimpft werden, und andererseits, wie selten unter natürlichen Bedingungen Gelegenheit gegeben ist, durch Kontakte oder von den Lungen aus Keime in so großer Menge aufzunehmen, daß die für gesunde Tiere ermittelte Dosis letalis minima

---

[1]) Literatur vgl. *B. Lange*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 1. 1924.

[2]) Zeitschr. f. Hyg. **106**, 1. 1926.

erreicht ist, so werden wir zu der Annahme gezwungen, daß bei seuchenhaften Massenerkrankungen der Meerschweinchen an Pneumokokkensepsis usw. *eine zeitlich erhöhte Disposition der Tiere für die Infektion* eine ausschlaggebende Rolle spielt. In der Tat läßt sich nun vielfach bei derartigen Seuchen ein Zusammenhang mit zeitlich begrenzten Schädigungen der natürlichen Resistenz der Tiere nachweisen. (Vgl. die Bemerkungen von *B. Lange* in der Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 48 und die demnächst mitgeteilten Beobachtungen von *Freund* über Stallseuchen bei Kaninchen und Meerschweinchen.)

Es sei endlich noch auf Beobachtungen über *pathologisch-anatomische Veränderungen* bei meinen Meerschweinchen hingewiesen. Wir sahen, daß zwar in der Regel dasjenige Organ, welches die Eingangspforte darstellt, in charakteristischer Weise erkrankt. Notwendig ist dies aber nicht. Sowohl bei der Milzbrand- wie bei der Hühnercholerainfektion habe ich nicht selten eine charakteristische hervorstechende Erkrankung der Eingangspforte vermißt. Andererseits sah ich ausgedehnte Pneumonie bei Tieren, welche mit dem Bacillus bipolaris septicus nicht von den Lungen aus, sondern auf anderem Wege infiziert waren.

Es dürfen also nicht unter allen Bedingungen ausschließlich auf Grund vorhandener hervorstechender Krankheitserscheinungen an Organen, die als Eingangspforten der natürlichen Infektion in Betracht kommen, oder aus dem Fehlen solcher Erscheinungen auf den tatsächlich beschrittenen Infektionsweg Schlüsse gezogen werden.

Schlußsätze.

I. Künstliche Infektion.

1. Vergleichende Untersuchungen mit Infektion auf parenteralem Wege zeigten, *daß beim Meerschweinchen das Unterhautgewebe für Milzbrand wesentlich empfänglicher ist als Blutgefäßsystem und Bauchhöhle.*

2. Die höhere Resistenz von Bauchhöhle und Blutgefäßsystem tritt *auch gegenüber höchstvirulenten „tierischen“ Milzbrandbacillen* deutlich in Erscheinung.

3. Im Gegensatz zum Meerschweinchen ist bei der Maus die höhere Empfänglichkeit des Unterhautgewebes nur unter gewissen Bedingungen nachweisbar: Sporenhaltige Kulturen infizierten zwar meist von der Subcutis aus noch mit kleineren Mengen als von der Bauchhöhle und vom Blutwege aus, aber sowohl bei Verimpfung von Sporen wie von sporenfreien „tierischen“ Bacillen *starben die intravenös und intraperitoneal geimpften Mäuse früher als die subcutan infizierten.*

4. Für Hühnercholera- und Paratyphus-B-Bacillen, die aus Fällen spontaner Meerschweinchensepsis isoliert waren, erwies sich *die Bauchhöhle des Meerschweinchens höher empfänglich als das Blutgefäßsystem*

und die Haut; der Erfolg der subcutanen Verimpfung kam allerdings teilweise dem der intraperitonealen ziemlich nahe.

5. Während bei Meerschweinchen für Pneumokokken alle drei Wege die gleiche *sehr geringe Empfänglichkeit* aufweisen, haben sie für den Tuberkelbacillus annähernd gleiche *höchste Empfänglichkeit.*

II. Natürliche Infektion.

6. Auch bei der Infektion auf den natürlichen Wegen tritt bei Meerschweinchen *die Affinität bestimmter Erreger zu gewissen Geweben des Körpers* sehr deutlich hervor. Sehr stark ausgesprochen ist *die Empfänglichkeit der Lungen* dem Tuberkelbacillus gegenüber, bei weitem nicht in dem Grade, aber doch noch ziemlich hoch für Milzbrandsporen und den Bacillus bipolaris septicus (Hühnercholerabacillus), sehr gering dagegen für Pneumokokken und Paratyphus-B-Bacillen. Die *Haut* ist hochempfänglich für Milzbrand, wenig für Hühnercholera- und Tuberkelbacillen, anscheinend überhaupt nicht empfänglich für Infektion mit Paratyphus-B-Bakterien und Pneumokokken. Die Empfänglichkeit des *Verdauungstraktus* ist für alle geprüften Bakterien eine geringe.

7. Abgesehen von der natürlichen aerogenen Infektion der Lungen mit Tuberkelbacillen, die in bezug auf kleinste wirksame Dosis und Verlauf der Infektion mit der parenteralen Infektion auf eine Stufe zu stellen ist, muß der Erfolg der experimentellen *natürlichen Ansteckung* verglichen mit der *künstlichen parenteralen* als *schlecht* bezeichnet werden. Ganz auffallend schlecht ist er bei Paratyphus-B-Bakterien, die, intraperitoneal verimpft, maximal virulent waren. Pneumokokken, die schon parenteral Meerschweinchen nur in sehr großen Mengen infizierten, wirkten von den natürlichen Eingangspforten aus überhaupt nicht.

8. Daß einige dieser Erreger (Hühnercholera-, Paratyphus-B-Bakterien, Pneumokokken) trotzdem mehrfach zu schweren septicämischen, sich endemisch ausbreitenden Spontanerkrankungen der Meerschweinchen führen, kann in befriedigender Weise nur aus einer *vorübergehend erhöhten Disposition* der Tiere für solche Infektionen erklärt werden.

9. Die Unregelmäßigkeiten der Ergebnisse mit natürlicher Infektion sind nur zum Teil durch Zufälligkeiten, in der Hauptsache durch *individuelle Resistenzverschiedenheiten* zu erklären.

10. In dieser Beziehung wie auch sonst ergibt sich mit unseren Beobachtungen über *natürliche Infektion an der Maus* weitgehende Übereinstimmung.

Literaturverzeichnis.

Adelheim, Klin. Wochenschr. 1924, S. 1721. — *Bachmann*, *Beltrami* und *Romat*, Compt. rend. de la soc. de biol. **89**, 1122. 1924. — *Besredka*, Die lokale Immunisierung. (Deutsch von G. Blumenthal.) J. A. Barth, Leipzig 1926. —

Buchner, Arch. f. Hyg. **8**, 145. 1888. — *Combiesco*, Compt. rend. de la soc. de biol. **90**, Nr. 11, S. 752. 1924. — *Gramatschikoff*, Baumgartens Arb. a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. I, 450. 1891/1892. — *Gratia*, Compt. rend. de la soc. de biol. **91**, Nr. 21, S. 113. 1924. — *Hertel*, Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt **20**, 453. 1904. — *Katz*, Proceeding of the Linnean society of New South Wales 1889. — *Katzu*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **94**, 165. 1925. — *Koenigsfeld*, Ebendort **60**, 30. 1911. — *Kolle*, Zeitschr. f. Hyg. **36**, 397. 1901. — *Kutscher* und *Meinicke*, Zeitschr. f. Hyg. **52**, 301. 1906. — *Lange, B.*, Zeitschr. f. Hyg. **102**, 224. 1924; Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 48, S. 1975. — *Lange, B.* und *Keschischian*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 569. 1924. — *Lange, B.* und *Nowosselsky*, Zeitschr. f. Hyg. **104**, 648. 1925. — *Nikolsky*, Ann. de l'inst. Pasteur **14**, 794. 1900. — *Ornstein*, Zeitschr. f. Hyg. **96**, 48. 1922. — *Suel*, Zeitschr. f. Hyg. **40**, 103. 1902. — *Sobernheim* und *Murata*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 691. 1924. — *Voges*, Zeitschr. f. Hyg. **23**, 149. 1896. — *Wollman*, Compt. rend. de la soc. de biol. **92**, 127. 1925.

(Aus dem Institut „Robert Koch", Berlin. — Abteilungsleiter: Prof. Dr. *Boecker*.)

Über die Beziehungen zwischen dem d'Herelleschen Lysin, dem Antilysin und den „Autotoxinen" (Conradi-Kurpjuweit).

Von
Dr. **Fritz Kauffmann,**
Assistent am Institut.

Bereits *Otto* und *Munter* haben sich in ihrer Arbeit „Weitere Untersuchungen zum d'Herelleschen Phänomen" (Zeitschr. f. Hyg. **100**, 3/4, S. 402) mit der Frage beschäftigt, ob die von *Eijkmann* an gegossenen Coliagarplatten festgestellten Hemmungserscheinungen in Beziehung zum d'Herelleschen Phänomen stehen. Diese von *Eijkmann* entdeckte Hemmungserscheinung ist von *Conradi* und *Kurpjuweit* weiter studiert und als Wirkung von „Autotoxinen" erklärt worden. *Otto* und *Munter* konnten an Coliagargemischen, denen vor dem Ausgießen zu Platten Antilysin zugesetzt war, eine sichere Beeinträchtigung der Hemmungswirkung nicht feststellen. Die Autoren lassen aber bei der nach ihrer Ansicht nicht genügenden Beweiskraft ihrer negativ verlaufenden Versuche die Beantwortung der Frage nach der Identität des Autotoxins mit dem d'Herelleschen Lysin offen, so daß weitere Untersuchungen hierüber am Platze waren. Zunächst habe ich diese Gelegenheit benutzt, um einige Untersuchungen über das Antilysin selbst anzustellen.

Als Ausgangsmaterial diente ein hoch wirksames Colilysin H (Titer 1 : 10^{-10}), der homologe Colistamm H sowie das durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem Lysin H gewonnene Antilysin H. Das hierzu benutzte Kaninchen 83 war in Zwischenräumen von 5 Tagen 8 mal mit Dosen von 2—5 ccm Lysin H unverdünnt intravenös immunisiert worden und hat im ganzen 26 ccm Lysin H erhalten. 10 Tage nach der letzten Injektion wurde es entblutet. Das Serum 83 neutralisierte das Colilysin H (1 : 100 verdünnt) bis zu einer Verdünnung von 1 : 200 absolut sicher; darüber hinaus hatte es, besonders bei schwächeren Lysinkonzentrationen, geringe Wirksamkeit.

Dieses Antilysin 83 agglutinierte, wie dies nach den Befunden von *Bordet, Cinca* u. a. zu erwarten war, den homologen lebenden Colistamm H, und zwar bis zur Verdünnung des Serums von 1 : 1600 +. Normales Kaninchenserum agglutinierte diesen Stamm nicht; andererseits wurde ein heterologer Colistamm von dem Antilysin 83 nicht agglutiniert.

Die Agglutinationswirkung des Antilysins gab die Möglichkeit, die Befunde von *Otto* und *Winkler* u. a. zu bestätigen, daß nach Absättigung der Agglutinine durch Bakterien die antilytische Fähigkeit erhalten bleibt.

Hierzu diente folgender Versuch:
5 ccm Antilysin 83 1 : 5 verdünnt in physiologischer NaCl-Lösung
+ 5 ccm dichte Aufschwemmung von Coli H in physiologischer NaCl-Lösung.
1 Stunde 37° Schrank.
Zentrifugieren.
5 ccm des Zentrifugenklares (der oben stehenden Flüssigkeit)
+ 5 ccm Coli H-Aufschwemmung.
1 Stunde 37° Schrank.
Zentrifugieren.

Falls das Zentrifugenklar noch keimhaltig ist, muß es filtriert werden, da sonst durch die Bacillen der folgende Abbindungsversuch mit dem Lysin gestört wird. In Vorversuchen war festgestellt worden, daß der antilytische Antikörper genau so wie das Lysin durch Porzellankerzen nach *Silberschmidt* filtrierbar ist, und daß auch die Agglutinine nur zum geringen Teil durch das Filter zurückgehalten werden.

1 ccm des obigen filtrierten Zentrifugenklares
+ 1 ccm Lysin H 1 : 100 in NaCl-Lösung.
1 Stunde 37° Schrank.

Dann wurde die lytische Wirkung im Auftropfverfahren (*Otto* und *Munter*) geprüft.

Resultat nach 24 Stunden: Es fehlt jegliche lytische Wirkung, das Antilysin ist also von den Bacillen nicht gebunden worden.

Die hierzu erforderlichen Kontrollen fielen folgendermaßen aus:

1. Der Agglutinationsversuch mit dem Antilysin 83 und dessen Filtrat bei Verwendung des Colistammes H ergab eine deutliche Agglutination bis 1600 +.

2. Der Agglutinationsversuch mit dem durch Coli 2 × abgesättigten Serum 83 und dem Filtrat des Serums 83 verlief glatt negativ.

3. Die Lysinprobe nach dem Auftropfverfahren *Otto* und *Munter* war stark positiv (kein Wachstum auf der Tropfenspur).

4. Der Bindungsversuch zwischen dem Lysin und Filtrat des Antilysins war positiv. Die lytische Wirkung fehlte auf der Platte vollständig.

Bei allen Kontrollen wurden natürlich dieselben Verdünnungen wie im Versuch selbst verwandt.

Der Versuch ergab also, daß trotz vollständiger Absättigung der Agglutinine die antilytische Wirksamkeit ganz erhalten war.

Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten von *Otto* und *Winkler*, *Weiss* und *Lloyd Arnold* u. a., die ebenfalls nach Absorption der Agglutinine, Präcipitine und Amboceptoren die antilytische Wirksamkeit ihres Antilysins vollständig erhalten fanden.

Um ein möglichst agglutininreiches, aber gleichzeitig antilytisches Immunserum zu erhalten, wurde ein Kaninchen 101 mit einer Mischung

von unverdünntem Lysin H und lebendem Coli H, der von der Platte mit der Öse in das Lysin hineingerieben wurde, in steigenden Dosen intravenös immunisiert. Das Kaninchen erhielt bei 5 Injektionen in Zwischenräumen von 5 Tagen im ganzen 22 ccm Lysin H unverdünnt und 12 Ösen lebenden Coli H. Das Serum hatte einen Agglutinationstiter von 1 : 12000 + und einen Antilysintiter wie das Serum 83 von 1 : 200. Der Agglutininabsättigungsversuch mit dem Serum 101 ergab nach der oben beschriebenen Methode (es wurden 4 × frische Bakterien zugesetzt) dasselbe Resultat wie beim Serum 83; d. h. die antilytische Wirksamkeit blieb trotz Absättigung der Agglutinine erhalten.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende theoretischen Schlüsse ziehen:

Im Antilysin sind zwei verschiedene Antikörper, das Antilysin und das Agglutinin, unabhängig voneinander, getrennt nachweisbar, denen im Lysin 2 entsprechende, verschiedene Antigene gegenüberstehen müssen. Die Frage nach der Natur des Lysins wird durch diese Feststellung nicht berührt (vgl. auch *Otto*, *Munter* und *Winkler*).

Wenn wir jetzt auf die Frage nach der *Identität des bakteriophagen Lysins mit den „Autotoxinen"* eingehen, so möchten wir auf die eingehende Darstellung der Befunde von *Eijkmann*, *Conradi* und *Kurpjuweit* verzichten und auf die Zusammenfassung von *Otto* und *Munter* in Band **100**, Seite 402, dieser Zeitschrift verweisen.

Otto und *Munter* bestätigen die Angaben von *Conradi* und *Kurpjuweit* derart, „daß angegangene Bouillonkulturen mit Gelatine oder Agar vermischt das Wachstum der nach dem Erstarren auf der Oberfläche der Nährböden ausgesäten Bakterienkeime mehr oder weniger verhinderten".

Conradi und *Kurpjuweit* haben aus ihren Versuchen den Schluß gezogen, daß in 24-Stunden-Bouillonkulturen von Bakterien, z. B. Coli, wachstumshemmende, thermolabile, Berkefeld-Filter nicht passierende, durch Schilfmembranen dialysierende, mehr oder weniger artspezifische „Autotoxine" vorhanden seien. Entgegen diesen Angaben ist es bereits *Eijkmann*, dem Entdecker dieser Erscheinungen, nicht gelungen, die Anwesenheit der Hemmungsstoffe in Bouillonkulturen nachzuweisen, sondern nur in Gelatine und Agar. Ein späterer Untersucher, *Hajos*, bestreitet, daß in „erschöpfter Bouillon" (Bouillon, die so lange beimpft, abzentrifugiert und wieder beimpft wurde, bis kein sichtbares Wachstum mehr in ihr auftrat) thermolabile Autotoxine vorhanden seien, und hat die geringe wachstumshindernde Wirkung seiner erschöpften Bouillon auf „gewisse thermostabile Stoffwechselprodukte" zurückgeführt.

Vor allem müssen aber hier die älteren Arbeiten von *Manteufel* und *Oebius* noch angeführt werden, die beide die „Autotoxine" von *Conradi* und *Kurpjuweit* nicht anerkennen wollen. *Manteufel* kann weder die regelmäßige Thermolabilität der Autotoxine in Agar noch ihre Anwesenheit überhaupt in Bouillon bestätigen. Besonders sei hier aber auf die Angabe von *Oebius* hingewiesen, der in vielen Variationen die Dialyse der Autotoxine aus Bouillonkulturen durch Celloidin und Schilfsäckchen vergeblich versuchte. Er schreibt: „Niemals habe ich, sofern die Außenflüssigkeit nicht durch Bakterien infiziert war, auch nur den geringsten entwicklungshemmenden Einfluß feststellen können, auch dann nicht, wenn die Außen-

flüssigkeit nach Ablauf der Diffusionszeit (15—36 Stunden) direkt mit einem Pilz beimpft wurde. Dagegen war der feindliche Einfluß der bakterienhaltigen Innenflüssigkeit immer ein äußerst intensiver.“ „Als Ursache des Wachstumsstillstandes sind nach wie vor 2 Faktoren anzusehen, die allmähliche Erschöpfung des Kulturmediums an Nährstoffen neben der Durchtränkung des Nährbodens mit bakteriellen, soweit bekannt, nicht spezifischen Stoffwechselprodukten.“

In letzter Zeit hat sich auch *Bail* mit diesen Fragen beschäftigt, und zwar in seiner Arbeit „Entstehung und Gesetze von Bakterienpopulationen“. „Auch die Anwesenheit von mehr oder weniger spezifischen Hemmungsstoffen (*Conradi-Kurpjuweit*) wird durch diesen Versuch widerlegt, wie auch sonst das Suchen nach solchen bisher ganz vergeblich war, wenigstens für die hier verwandten Bakterien.“ Das Gesetz der M-Konzentration, das besagt, „daß es für jede Bakterienart eine Höchstzahl von Individuen gibt, welche in der Maßeinheit einer Nährlösung gleichzeitig lebend vorhanden sein können“, muß wohl auch bei Agarkulturen berücksichtigt werden.

Wenn wir nun weiter von „Autotoxinen“ sprechen, so gebrauchen wir diesen Ausdruck nicht in dem Sinne von *Conradi* und *Kurpjuweit*, sondern meinen damit nur Hemmungsstoffe, deren Natur noch zweifelhaft ist. Dabei legen wir nur der Einfachheit halber die Fiktion zugrunde, daß es sich hierbei um chemische Vorgänge handelt.

Gehen wir nun zu unseren eigenen zahlreichen Versuchen über, so muß zunächst einem Fehlschluß, dem zwar nicht *Eijkmann*, aber *Conradi* und *Kurpjuweit* verfallen sind, entgegengetreten werden. Es handelt sich dabei um folgenden Schluß: Mischt man eine 24stündige Bouillonkultur von Coli unverdünnt oder verdünnt in Agar und impft sofort nach Erstarren auf die Oberfläche der Platte Coli, so ist nach 24stündiger Bebrütung in der Regel kein Oberflächenwachstum zu sehen. Daraus folgt aber noch nicht, daß in der Bouillonkultur Autotoxine enthalten waren. Die Autotoxine brauchen nämlich gar nicht in der Bouillonkultur vorhanden gewesen, sondern können im Agar entstanden sein; daß dieses letzte tatsächlich der Fall ist, wird durch folgende Beobachtung wahrscheinlich: Von einer 24stündigen Agarplattenkultur von Coli wird eine der 24stündigen Bouillonkultur an Dichte entsprechende Aufschwemmung mit der Öse in physiologischer Kochsalzlösung gemacht, davon 2 ccm in 15 ccm flüssigen Agar gemischt, zu einer Platte gegossen und sofort nach Erstarren oberflächlich beimpft.

Nach 24stündiger Bebrütung ist das Oberflächenwachstum vollkommen gehemmt, genau so wie bei dem Bouillonkulturversuch. Hierbei hat man es in der Hand, durch quantitative Einsaat stets komplette, schwache und gar keine Hemmungswirkung zu erzeugen, gleichgültig ob man Bouillonkulturen oder Kochsalzaufschwemmungen nimmt.

Der Fehlschluß von *Conradi* und *Kurpjuweit* zieht einen zweiten nach sich, der die Thermolabilität der Autotoxine in der Bouillon annimmt. Die Autoren fanden, daß Temperaturen, die die Bakterien der Bouillonkultur abtöten, auch die Autotoxine vernichten, und schlossen

auf die Thermolabilität der Autotoxine. Die Beobachtung ist richtig, die Schlußfolgerung aber durchaus nicht zwingend; denn dadurch, daß die Bakterien in der Bouillon abgetötet sind, können sie nach Einsaat in den Agar dort ihre hemmende Wirkung nicht entfalten. (Vgl. auch die sterile, klare Platte bei Einsaat abgetöteter Kultur mit der diffus trüben, bewachsenen Platte bei Einsaat lebender Kultur!)

Demnach ist es verständlich, daß alle Autoren hinsichtlich dieser Thermolabilität der Bouillonkulturen übereinstimmen, dagegen nicht in der Thermolabilität der bereits hemmend wirkenden 24stündigen Agarplatten.

Unsere eigenen Versuche haben meistens zu keiner vollständigen Regeneration der Platten, auch bei 2stündiger Erhitzung im Dampftopf, geführt. Das Wachstum auf solchen Platten war gegenüber der Kontrolle sehr mäßig; häufig blieb die Hemmung sogar komplett bestehen. Zum mindesten müssen also neben thermolabilen Stoffwechselprodukten thermostabile angenommen werden.

Ferner ist es mir in häufig wiederholten Versuchen niemals gelungen, Hemmungsstoffe in stunden- bis monatealten Bouillonkulturen von Coli durch Zentrifugieren, Filtrieren durch Porzellanfilter, Dialysieren durch Kollodiummembranen und durch Schilfsäckchen nachzuweisen, genau so wie es oben schon von *Oebius* mitgeteilt ist. Die Diffusionsversuche, auch mit Coliagarkulturen, habe ich sogar bis auf 6 Tage Dauer ausgedehnt. Bei den Versuchen mit Schilfsäckchen tritt die oft bakteriendurchlässige Beschaffenheit derselben störend auf (eine wichtige Fehlerquelle!). In unseren Versuchen konnten also Autotoxine in Bouillonkulturen in keiner Weise nachgewiesen werden.

Entsprechend den Versuchen von *Otto* und *Munter* konnte durch *Mischung von Antilysin zu Coliagarplatten niemals eine Aufhebung der autotoxischen Eigenschaft der Platte demonstriert werden*; auch dann nicht, wenn die Colieinsaat in den Agar so klein gewählt wurde, daß die Hemmungserscheinung an der Oberfläche sehr gering ausfiel. Man kann durch diese verschiedene Bacilleneinsaat den Grad der Hemmung variieren und hat die Versuchsbedingungen einigermaßen exakt in der Hand. Mit zunehmender Zahl der eingesäten Bakterien nimmt naturgemäß die Größe der einzelnen Kolonien ab, ihre Zahl aber zu. Makroskopisch sieht solch eine Platte diffus getrübt aus, mit fast spiegelnder Oberfläche. Betrachtet man aber die Platte mit der Lupe, so erkennt man winzigste, ungeheuer dicht stehende Kolonien sowohl an der Oberfläche wie in der Tiefe. Impft man von der Oberfläche auf normale Agarplatten ab, so erhält man große runde Colikolonien. Es ist daher nicht ganz verständlich, wenn *Conradi* und *Kurpjuweit* in ihren Protokollen angeben, daß die mit 24stündigen Bouillonkulturen von Coli gegossenen Platten oberflächlich und in der Tiefe ohne Wachstum blieben. Derartige Resultate

haben wir mit den verschiedensten Colistämmen, die frisch aus Stühlen gezüchtet waren, niemals erhalten; auch nicht mit 2 sog. Mutaflor-Colistämmen, die uns Herr Prof. *Nissle*, Freiburg i. Br., freundlichst zur Verfügung stellte. Die Stärke der Hemmung steht zur Größe der Bacilleneinsaat in proportionalem Verhältnis, niemals aber kommt es zur Abtötung der Keime.

Schlußsätze.

1. Im d'Herelleschen Antilysin sind zwei verschiedene Antikörper unabhängig voneinander, getrennt nachweisbar, das Antilysin und ein antibakterieller Immunkörper (geprüft an der Agglutinationswirkung).

2. Die Anwesenheit von „Autotoxinen“ (*Conradi* und *Kurpjuweit*) in Bouillonkulturen wird bestritten. Daß die bei Aussaat von Colikeimen auf und in gegossenen Agarplatten wahrnehmbare Hemmungswirkung durch diffusible, thermolabile, spezifische Autotoxine (*Conradi* und *Kurpjuweit*) bedingt wird, ist nicht bewiesen.

3. Die Identität des d'Herelleschen Lysins mit dem Autotoxin wird (unter Bestätigung der Versuche von *Otto* und *Munter*) abgelehnt.

Literaturverzeichnis.

Bail, Arch. f. Hyg. **95**, 1. — *Conradi* und *Kurpjuweit*, Münch. med. Wochenschr. 1905, S. 1761, 2164, 2228. — *Eijkmann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **37**, 436,; **41** 367; Berl. klin. Wochenschr. 1906, S. 499; Dtsch. med. Wochenschr. 1907, S. 265. — *Hajos*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **88**, 583. — *Manteufel*, Berl. klin. Wochenschr. 1906, S. 313. — *Oebius*, Med. Klinik 1906, S. 598. — *Otto*, *Munter* und *Winkler*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, H. 1. 1922. — *Otto* und *Munter*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**, 3/4, 402. — *Otto* und *Winkler*, Dtsch. med. Wochenschr. 1922, S. 383. — *Weiss* und *Lloyd Arnold*, Zentralbl. f. d. ges. Hyg. **9**, 58 und **10**, 9. 1924.

(Aus dem Institut für exper. Therapie „Emil von Behring", Marburg a. d. Lahn.
Direktor: Prof. *Dold*.)

Ein Verfahren, die maximalen und minimalen Keimzahlwerte von Bakteriensuspensionen zu bestimmen.

Von
Privatdozent Dr. **Hans Schmidt**.

Mit 1 Textabbildung.

Von *Dold*[1]) ist kürzlich in einer kritischen Arbeit darauf hingewiesen worden, daß jedes Verfahren, die Anzahl der Keime in einem Kubikzentimeter einer gegebenen Bakteriensuspension zu bestimmen, durch mehr oder weniger große Fehlerquellen höchst unsichere Ergebnisse liefert, was um so bedauerlicher ist, als die Einstellung der Keimzahl auf nephelometrischem Wege, d. h. der Vergleich der Trübung einer Bakteriensuspension mit einer Standardtrübung, eine relativ große Genauigkeit zuläßt. Aber jeder nephelometrischen Bestimmung, sofern sie eine bestimmte Keimzahl angibt und sich nicht auf eine Vergleichsangabe gegenüber der Standardtrübung beschränkt, muß notwendig eine Auszählung nach irgendeinem Verfahren zugrunde liegen. Die einzelnen Verfahren zur direkten Keimzählung sind von *Dold* in der obengenannten Arbeit einer kritischen Betrachtung unterzogen worden. Das Bedürfnis, der primären Keimzahlbestimmung, die gewissermaßen einer Eichung der Nephelometer-Standardtrübung entspricht, eine möglichst große Sicherheit zu geben, veranlaßt mich, das folgende Verfahren zu empfehlen und zu dessen weiterem Ausbau aufzufordern. Ich möchte aber von vornherein vermeiden, den Anschein zu erwecken, als ob ich nun eine Methode bringen wollte, die Keimzahl *genau* anzugeben. Das ist vollkommen unausführbar und wird auch so bleiben, wenn die Zukunft nicht gänzlich neue und unvorhergesehene Möglichkeiten dazu bringt. Mein Verfahren besitzt natürlich auch Fehler, aber diese liegen weniger auf subjektivem Gebiete und können daher objektiv besser bewertet werden. Ich komme auf die Fehler weiter unten zu sprechen.

Das von mir vorgeschlagene Verfahren hat gewisse Ähnlichkeit mit dem von *Georg Dichtl*[2]), der abgemessene Mengen einer Bakterienauf-

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 45.
[2]) Arch. f. Hyg. **89**, H. 1—3.

schwemmung in Trommsdorffschen oder Rosenthalschen Zentrifugenröhrchen zentrifugiert und das Volumen des ausgeschleuderten Bodensatzes bestimmt. Mein Verfahren beruht auf der Zentrifugierung einer mit der zu untersuchenden dichten Bakteriensuspension angefüllten Capillare und Messung der abgesetzten Bakteriensäule sowie der gesamten Flüssigkeitssäule in der Capillare. Rechnerisch *genau* durchführbar ist jedoch dieses Verfahren nur unter der Annahme, daß die Bakterien Kugelform haben, was man in erster Annäherung nur von den Kokken sagen kann. Ich habe im folgenden das Verfahren nur für den Staphylococcus albus genau durchgeführt.

12stündigen Schrägagarkulturen von Staphylococcus albus wird zunächst mit Capillarpipette das Kondenswasser abgesaugt. Dann werden die Kulturrasen mit physiol. NaCl-Lösung abgeschwemmt und die Suspension durch mehrmaliges Waschen mit NaCl-Lösung gründlichst von allem in Lösung befindlichen Nährbodenmaterial befreit. Im Anschluß daran wird möglichst bald die Suspension eine Stunde lang auf 65—68° gehalten, um die bei Staphylokokken bekanntlich sehr schnell einsetzende Lyse zu vermeiden[1]). Nun wird kräftig geschüttelt und erneut, aber diesmal in Anlehnung an das Verfahren von *Perrin*[2]) fraktioniert zentrifugiert, um einerseits Konglomerate von Bakterien und Verunreinigungen und andererseits allerkleinste Kokken und Kokkenteilchen zu entfernen, so daß eine möglichst homogene, nur aus Teilchen möglichst gleicher Größe bestehende Suspension erzielt wird. Dies ist natürlich nur bis zu einer gewissen Annäherung möglich. Nun wird in eine enge ca. 10—11 cm lange dickwandige Glascapillare, deren Lumen einen Radius von 0,02 bis 0,03 cm hat, zuerst etwas Quecksilber, dann möglichst viel von der zu untersuchenden Suspension aufgesogen und dann das eine Ende der Capillare mit etwas Siegellack gut verschlossen. Man kann natürlich durch Messung mit Quecksilber unter Berücksichtigung des Ausdehnungskoeffizienten den Radius der Capillare auf $^1/_{100}$ mm genau bestimmen, doch erübrigt sich diese Messung, da, wie wir gleich sehen, der Radius der Capillare aus der Rechnung herausfällt. Nun wird die Capillare scharf zentrifugiert mit mindestens 2000 Touren pro Minute, besser sind Zentrifugen mit 6—8000 Touren, und zwar so lange, bis wiederholte Kontrolle unter dem Okularmikrometer des Mikroskops keine Änderung in der Höhe der Bakteriensäule und eine scharfe Abgrenzung erkennen läßt. Das Quecksilber hat den Zweck, eine scharfe Ablesung des unteren Endes der Bakteriensäule zu ermöglichen.

Bezeichnen wir mit r den Radius der Capillare, mit h die Höhe der Bakteriensäule und mit H die Höhe der Flüssigkeitssäule, vom Quecksilberspiegel an gemessen, dann hätten wir zu berechnen, wieviel Kokken

[1]) *H. Schmidt* und *A. Greifenstein*, Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 23.
[2]) *J. Perrin*, Kolloidchem. Beih. **1**, 244. 1910.

als Kugeln gedacht in den zylindrischen Raum $\pi r^2 h$ hineingehen. Dafür müssen wir aber vorerst die Größe eines Staphylococcus albus oder den Radius ϱ seiner als Kugel gedachten Form kennen.

Diese Bestimmung wurde durch Messung des spezifischen Gewichtes und Anwendung der Stokesschen Formel der Fallgeschwindigkeit kleiner Kugeln in einer Flüssigkeit ausgeführt.

Zunächst wurde das spez. Gewicht dadurch ermittelt, daß die Staphylokokken in eine gesättigte wässerige Lösung von Kal. carbonat. gebracht wurden und so lange Wasser zugefügt wurde, bis es selbst durch schärfstes Zentrifugieren nicht mehr gelang, die Suspension nach oben oder nach unten zu klären. Das spez. Gewicht der Flüssigkeit wurde dann mittels Pyknometers zu 1,292, in einem anderen Versuch zu 1,293 gefunden, so daß 1,29 als das spez. Gewicht des Staphylococcus albus angenommen wurde.

Um die Fallgeschwindigkeit zu ermitteln, wurde eine Staphylokokkensuspension in NaCl-Lösung, die mit fraktionierter Zentrifugierung vorbehandelt war, in einer genau senkrecht aufgestellten und konstant bei der Temperatur von 20° Celsius gehaltenen Bürette der spontanen Sedimentation überlassen. Die Bürette hatte ein Lumen von ca. 15,8 mm, und ein Teilstrich der Bürette entsprach 0,529 cm. Im folgenden gebe ich das Protokoll eines solchen Versuches:

Ablesung nach Stunden	Skala der Bürette	Fallweg in cm umgerechn.	Fallweg in cm/sec^{-1} · 10^{-4}
48	2,75	1,45	0,083
72	4	2,11	0,081
102	6	3,17	0,086
120	7,6	4,02	0,093
144	9,2	4,86	0,093
150	9,5	5,02	0,092
168	10,5	5,55	0,091
191	11,7	5,85	0,085
214	13	6,87	0,089
240	14,5	7,67	0,088
		Mittelwert	$a = 0,088 \cdot 10^{-4}$ cm/sec^{-1}.

Nach der Stokesschen Formel berechnet sich der Radius einer in einer Flüssigkeit fallenden kleinen Kugel als

$$\varrho = \sqrt{\frac{\eta \cdot a \cdot 9}{2\,g \cdot (S_1 - S_2)}}\,.$$

Hierin bedeuten η = Zähigkeit der Flüssigkeit. η (Wasser) 20° = 0,010;
g = 981 cm;
$a = 0,088 \cdot 10^{-4}$ cm · sec^{-1};
S_1 = spez. Gew. der Kugel = 1,29;
S_1 = spez. Gew. der Flüssigkeit = 1,0.

Setzt man diese Werte in die Formel ein, so erhält man $\varrho = 0{,}37\ \mu$. Da nun in einer wässerigen Suspension ein Staphylokokkus stets von einer fest anhaftenden Flüssigkeitsschicht umgeben ist, so wird $\varrho = 0{,}4\ \mu = 4 \cdot 10^{-5}$ cm angenommen. Dieser Wert entspricht der in der Literatur nach vielen übereinstimmenden Messungen für den Durchmesser angegebenen Größe eines einzelnen Staphylokokkus von $0{,}7-0{,}9\ \mu$.

Wir können nun an die Aufgabe gehen, zu berechnen, wie viele solcher Kugeln mit dem Radius $\varrho = 4 \cdot 10^{-5}$ cm in den Zylinderraum $\pi r^2 h$ hineingehen können. Hierbei ist zunächst zu berücksichtigen, daß für eine ganz exakte Rechnung der Rand des Zylindermantels Schwierigkeiten macht; man müßte denn schon annehmen, daß r ein ganzes Vielfaches von ϱ ist. Da aber die Größenordnungen von $r = 2 \cdot 10^{-2}$ und $\varrho = 4 \cdot 10^{-5}$ im Verhältnis 1 : 1000 stehen, so kann man diese Schwierigkeit außer acht lassen. Nun sind zwei Fälle denkbar. Einmal könnten die Kugeln maximal deformierbar sein, d. h. der verfügbare Raum $\pi r^2 h$ wäre lückenlos mit Kugeln angefüllt. Die Anzahl solcher Kugeln, deren Volumen $\frac{4}{3} \pi \varrho^3$ ist, die unter dieser Bedingung in $\pi r^2 h$ enthalten sein können, ist offenbar das Maximum und ist gegeben als

$$Z_{\max} = \frac{3 r^2 h}{4 \varrho^3}.$$

Der zweite Fall ist die Annahme, daß die Kugeln überhaupt nicht deformierbar sind, so daß bei ihrer Aneinanderlagerung Zwischenräume übrigbleiben. Bei engster Packung nichtdeformierbarer Kugeln berührt jede Kugel 12 andere, und zwar 6 in der gleichen Schicht und je 3 in der darüber bzw. darunter befindlichen Schicht. Eine Kugel, die in gleicher Schicht 6 andere berührt, bildet mit diesen 6 Zwickel, wenn man mit diesem Wort den eigenartigen Raum zwischen je 3 Kugeln bezeichnet. Nun ersieht man leicht, daß in der darüber befindlichen Schicht (deren Abstand die Höhe des aus den Mittelpunkten 4 sich berührender Kugeln gebildeten Tetraeders ist) nur in jedem zweiten Zwickel sich eine Kugel befinden kann, so daß also auf die 6 Zwickel 3 Kugeln kommen. Befinden sich in der unteren Kugelschicht die 3 Kugeln in den gleichen Zwickeln, so begrenzen die Tangentialebenen um die mittelste der 12 andere Kugeln berührenden Kugel ein Raumgebilde, das ein Polyeder mit 6 Rhomben und 6 Trapezen als Seitenflächen darstellt. Legt man aber die 3 unteren Kugeln in die 3 anderen Zwickel, so begrenzen die Tangentialebenen ein reguläres Rhombendodekaeder. Beide Polyeder sind inhaltsgleich, und beide haben die Eigentümlichkeit, den Raum beim Aneinanderlagern lückenlos auszufüllen.

Nun ist der Rauminhalt eines Rhombendodekaeders durch den Radius der eingeschriebenen Kugel ausgedrückt: $V = 4 \varrho^3 \sqrt{2}$, und von solchen Körpern gehen in den Zylinderraum $\pi r^2 h$

$$Z_{\min} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot h}{4\,\varrho^3 \sqrt{2}}\,.$$

Dieser Ausdruck gibt die Anzahl der Kugeln an, die maximal in den Zylinderraum hineingehen, wenn jedwede Deformierung der Kugeln ausgeschlossen ist. Im Gegensatz zu dem weiter oben erhaltenen Maximum ist diese Anzahl ein Minimum[1]).

Nun war die Anzahl z der Staphylokokkenkugeln vor dem Zentrifugieren in dem Zylinderraum $\pi r^2 H$, wenn H die ganze Länge der in die Capillare aufgesogenen Suspension bezeichnet. Um nun die Anzahl x von Staphylokokken zu finden, die 1 ccm der Suspension enthält, müssen wir die für z gefundenen Ausdrücke durch $\pi r^2 H$ dividieren und erhalten dadurch

$$x_{\max} = \frac{h}{H} \cdot \frac{3}{4\,\pi\,\varrho^3} = \frac{h}{H} \cdot 3730 \cdot 10^9\,;$$

$$x_{\min} = \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{4\,\varrho^3 \sqrt{2}} = \frac{h}{H} \cdot 2762 \cdot 10^9\,.$$

Eine gewisse Deformierbarkeit der Kokken, die von dem Zentrifugaldruck abhängig sein wird, müssen wir wohl annehmen. Es läßt sich berechnen, daß die spontane Sedimentiergeschwindigkeit eines Kokkus unter dem Einfluß einer Zentrifuge, die den Kokkus im Abstand von 15 cm von der Drehachse 1800 mal in der Minute herumschleudert, 23,2 mal größer wird. Bei einer starken Zentrifuge, die bei gleichem Abstand 6000 Touren pro Minute liefert, wird die Sedimentiergeschwindigkeit 77 mal größer. In einem solchen Schwerefeld ist eine geringe Deformierung wahrscheinlich.

Andererseits sind alle Kokken benetzt, also von einer Wasserhülle umgeben, die sie auch bei allerschärfster Zentrifugierung nicht abgeben. Diese festanhaftende Wasserhülle vergrößert etwas das Volumen der Kokken, so daß dadurch der Minimalwert von x eher noch kleiner wird; für das Wasser bleiben jedoch die Zwischenkugelräume übrig, und die, wenn auch geringe Deformierung sucht die Minimalzahl für x wieder zu vergrößern. Bei diesen Überlegungen ist natürlich Voraussetzung, daß die benutzte Zentrifuge auch stark genug ist, eine möglichst enge Pakkung unter Verdrängung alles Wassers mit Ausnahme der sehr dünn vorzustellenden festhaftenden Hülle zu bewirken.

[1]) In 1 cmm befinden sich danach maximal $3{,}73 \cdot 10^9$ und minimal $2{,}75 \cdot 10^9$ Staphylokokken. Nach *Dichtl* enthielt 1 cmm Zentrifugat $0{,}8$—$1{,}2 \cdot 10^9$ Staphylokokken. Diese Zahl ist, da durch Plattenverfahren bestimmt, sicher zu niedrig. 1 mg Kulturmasse würde, da ein Staphylokokkus $^4/_3\,\pi \cdot 4^3 \cdot 1{,}29 \cdot 10^{-15}$ Gramm wiegt, theoretisch $2{,}9 \cdot 10^9$ Kokken enthalten; in Wirklichkeit wohl weniger wegen anhaftenden gequollenen Nährbodenmaterials.

Die wirkliche Keimzahl der Staphylokokkensuspension wird zwischen x_{max} und x_{min} liegen, und zwar wahrscheinlich näher an x_{min}. Ich erblicke den Wert dieser Feststellung darin, daß man nun bei einer gegebenen Staphylokokkensuspension mit voller Sicherheit angeben kann, daß die Keimzahl den Wert x_{max} unter keinen Umständen übertreffen kann, und daß andererseits x_{min} einen Wert liefert, der mit größter Wahrscheinlichkeit unterhalb der wahren Keimzahl liegt. Wir haben mithin die wirkliche Keimzahl in 2 Grenzen eingeschlossen.

Zur Erläuterung des Verfahrens seien Messungen an 3 verschiedenen Staphylococcus-albus-Suspensionen wiedergegeben:

h ist jedesmal mit dem Mikroskop unter Zuhilfenahme eines Okularmikrometers gemessen worden und *H* durch Vergleich mit einem Präzisionsmaßstab unter sorgfältiger Vermeidung parallaktischer Verschiebung.

Staph.-albus-Suspension	h cm	H cm	$\frac{h}{H}$	x_{max}	x_{min}	Gefunden nach *Wright*
I	0,094	7,88	0,012	$44{,}7 \cdot 10^9$	$33{,}1 \cdot 10^9$	$35 \cdot 10^9$
II	0,11	8,45	0,013	$48{,}5 \cdot 10^9$	$35{,}9 \cdot 10^9$	$36 \cdot 10^9$
III	0,22	8,9	0,0247	$92{,}2 \cdot 10^9$	$68{,}3 \cdot 10^9$	$77 \cdot 10^9$

Wir sehen also, daß die nach dem bekannten Verfahren von *Wright* (Vergleich der Bakterienzahl mit der Blutkörperchenzahl) gefundenen Zahlenwerte tatsächlich innerhalb der beiden Grenzen liegen und mehr nach dem x_{min}-Wert zu neigen. Nach den kritischen Untersuchungen von *E. Glynn*, *M. Powell*, *Armstrong Rees* und *Lissant Cox*[1]) unterschätzt die Wrightsche Methode die Keimzahl mit ca. 100%. Am genauesten arbeitete in der Hand dieser Verfasser das Zählkammerverfahren mit Hämocytometer, dessen Fehler beim Vergleich der Methoden im Durchschnitt 5% nicht überschritt.

Wir werden jedoch niemals in der Lage sein, die Keimzahl einer Bakteriensuspension wirklich genau angeben zu können, und ceteris paribus wird diejenige Methode den Vorzug verdienen, die verhältnismäßig einfach zu handhaben ist und bei Wiederholung möglichst genau den gleichen Wert gibt. Letztere Forderung halte ich für wesentlicher als eine Genauigkeit, die im Grunde doch nur eine Pseudogenauigkeit ist.

Folgende Versuche sollen zeigen, welchen Grad von Zuverlässigkeit die Keimzahlbestimmung nach obigem Verfahren bei mehrfacher Wiederholung gewährleistet.

---

[1]) Journ. of pathol. a. bacteriol. **17**, 379. 1914.

1. Eine und dieselbe Staphylokokkensuspension wurde 10 mal mit dem gleichen Verfahren gemessen mit dem Ergebnis folgender Tabelle:

	H cm	h cm	$\frac{h}{H}$
1	9,00	0,49	0,0544
2	9,40	0,50	0,0531
3	7,85	0,41	0,0522
4	9,25	0,49	0,0529
5	9,90	0,51	0,0515
6	8,65	0,45	0,0520
7	8,57	0,45	0,0525
8	9,80	0,51	0,0520
9	9,10	0,49	0,0549
10	9,88	0,52	0,0526

Mittel: $0,0528 \cdot 3730 \cdot 10^9 = x_{max} = 196,94 \cdot 10^9$

$\cdot 2761 \cdot 10^9 = x_{min} = 145,83 \cdot 10^9$

Mittel: $171,3 \cdot 10^9$

Die Staphylokokkensuspension dieses Versuches ist die gleiche, der im folgenden Versuch als „unverdünnt" mit nur einmaliger Bestimmung die Keimzahl $172 \cdot 10^9$ gegeben wurde. Aus den 10 Bestimmungen des $\frac{h}{H}$-Wertes geht hervor, daß die Schwankungen zwar gering sind, daß es sich aber doch empfiehlt, mehrere Bestimmungen auszuführen.

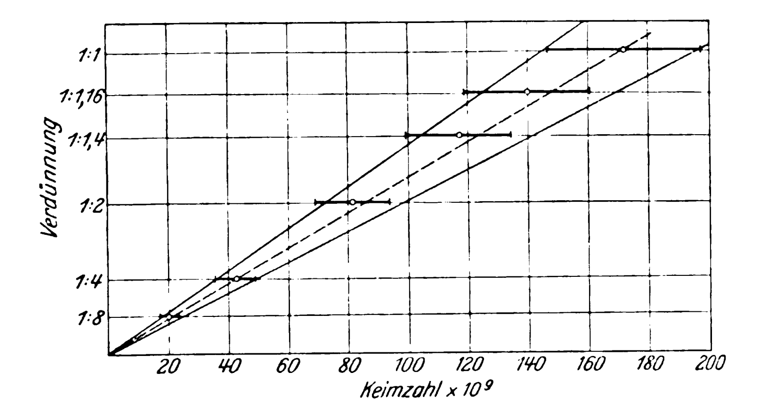
2. Die gleiche Staphylokokkensuspension des Versuches 1 wurde mit NaCl-Lösung in wechselndem Verhältnis verdünnt und jedesmal von der betreffenden Verdünnung eine einmalige Keimzahlbestimmung nach obigem Verfahren gemacht, um zu sehen, wie weit sich die aus der Verdünnung errechenbaren Werte von den gemessenen unterscheiden.

Die Werte der folgenden Tabelle wurden auch graphisch (s. Abb.) dargestellt, um die mit der wachsenden Bakteriendichte steigende Differenz zwischen Maximal- und Minimalkeimzahl besser zu veranschaulichen.

Verdünnung	H cm	h cm	$\frac{h}{H}$	$x_{max} \times 10^9$	$x_{min} \times 10^9$	Mittelwert $\times 10^9$	Keimzahl, errechn. aus d. Verdünn. von Keimzahl $171,8 \times 10^9$	Abweichung der gemessenen von der errechneten Keimzahl in %
1. unverdünnt	9,35	0,50	0,053	197,7	146,4	172,0	171,3	4,0
2. 1 : 1,16	9,85	0,43	0,043	160,4	118,8	139,5	146,8	4,9
3. 1 : 1,4	10,07	0,37	0,036	134,3	99,4	116,8	122,3	4,4
4. 1 : 2	9,90	0,25	0,025	93,2	69,0	81,1	85,6	5,2
5. 1 : 4	9,80	0,13	0,013	48,5	35,9	42,1	42,8	1,6
6. 1 : 8	9,90	0,06	0,0063	23,5	17,4	20,4	21,4	4,6

Obwohl hier die Messungen von h nur durch Abschätzung mit einem Millimetermaßstab gemacht wurden, ergaben die Werte für die Keimzahl

eine genügend scharfe Übereinstimmung mit den Werten, die sich aus der Verdünnungszahl der Stammlösung errechnen lassen. Die Abweichungen der beobachteten Keimzahlen betragen zwischen 1,6 und 5,2% der errechneten, wobei neben den Fehlerquellen des Meßverfahrens noch der Verdünnungsvorgang mit seinen Fehlern zu berücksichtigen ist. Die Abbildung zeigt deutlich, wie bei geringeren Keimdichten die Begrenzung der wirklichen Keimzahl zwischen den beiden als Max. und Min. bezeichneten Werten eine viel engere ist als bei sehr hohen Keimdichten, so daß sich für dieses Verfahren auch aus diesem Grunde nicht allzu hohe Keimdichten empfehlen. Der andere Grund liegt im Okularmikrometer und wird weiter unten nochmals berührt.



Ich glaube auf Grund dieser Versuche sagen zu können, daß dieses Verfahren genügend scharf arbeitet, um bei Wiederholungen gute Übereinstimmung zu erhalten. Es bietet mithin einen gangbaren Weg, schnell und einfach die Keimzahl einer Bakteriensuspension (z. B. als arithmetisches Mittel der gemessenen Grenzwerte) festzulegen. Ich sage ausdrücklich festlegen im Sinne eines Übereinkommens und nicht bestimmend im Sinne der Rechnung.

Untersuchen wir nun die Nachteile und Fehlerquellen des Verfahrens, so ergibt sich als erster Nachteil, daß sich diese Messung nur an dichten Bakteriensuspensionen machen läßt. Ist die Keimzahl von vornherein zu klein, so stellen sich der Messung Schwierigkeiten entgegen, die in der Weite der Capillare liegen. Die Genauigkeit der Messung steigt mit der Enge der Capillare, aber mit zunehmender Enge nimmt die gesamte zum Versuch genommene Bakteriensuspensionsmenge entsprechend ab. Die Glascapillaren länger als 10 cm zu nehmen, verbieten die handelsüblichen Zentrifugen. Andererseits ist die Schwierigkeit des Einfüllens von Quecksilber und der Bakteriensuspension in sehr engen Capillaren sehr erschwert. Ich nehme die Einfüllung gewöhnlich mit einer Gummi-

saugkappe vor, weswegen die Glascapillare dick genug sein muß, um einen dichten Verschluß der Saugkappe zu ermöglichen. Bei sehr engen Capillaren kommt noch hinzu, daß die Viscosität sich sehr bemerkbar macht, insofern es einer sehr viel größeren und länger einwirkenden Zentrifugalkraft bedarf, um in einer sehr engen Capillare eine völlige Scheidung von Bakterien und Suspensionsflüssigkeit zu ermöglichen. Am besten bewährten sich mir Glascapillaren mit einem Radius von 0,02 cm.

Beschränkt man solche Messungen zu Eichungen von Nephelometern oder dem Doldschen Turbidometer, so steht nichts im Wege, von genügend dichten Bakteriensuspensionen auszugehen.

Der zweite Nachteil liegt in dem Umstand, daß das Verfahren für nichtkugelförmige Bakterien nur unter willkürlichen Vereinfachungen verwendbar ist, auf die weiter unten noch näher eingegangen wird.

Was die *Fehlerquellen* anbetrifft, so liegen diese erstens in dem Wirkungsgrad der Zentrifuge und zweitens in dem Grade, mit dem eine scharfe Ablesung mit dem Mikrometer möglich ist, und drittens in der Ungleichheit der Capillaren.

Die Zentrifuge muß nicht nur eine völlige Scheidung von Bakterien und Flüssigkeit bewirken, sondern auch noch die Bakterien so eng als irgend möglich zusammenlagern. Ist dies nicht der Fall, so wird der Wert für die Länge der Bakteriensäule größer ausfallen und damit auch die errechneten Maximal- und Minimalwerte. Fände man also im Beispiel 1 statt $h = 0{,}094$ cm $h = 0{,}12$ cm, dann wäre $\frac{h}{H} = 0{,}015$ und $x_{max} = 55{,}9 \cdot 10^9$ und $x_{min} = 41{,}4 \cdot 10^9$, also nicht nur eine größere Zone zwischen den beiden Werten, sondern auch eine Gesamtverschiebung im Sinne einer zu großen Keimzahl festzustellen.

Voraussetzung ist daher eine sehr leistungsfähige Zentrifuge, die man so lange laufen lassen muß, bis das Mikroskop keine Änderung der Länge der Bakteriensäule mehr erkennen läßt; und damit komme ich zu der zweiten Fehlerquelle, nämlich der Messung unter dem Mikroskop.

Trotzdem man sich schwacher Systeme bedienen wird, wird man die Grenzen der Bakteriensäule nicht sehr scharf erkennen können. Das liegt einmal daran, daß die untere Grenze nie ganz scharf ablesbar ist wegen der Konvexität der Quecksilberoberfläche. Ich habe im Anfang meiner Versuche die untere Abgrenzung oft nur mit Siegellack bewerkstelligt, den ich flüssig stark gegen die Capillaröffnung anpreßte und einige Millimeter weit hineinpreßte. Unter dem Mikroskop war aber diese Grenze nicht immer scharf genug, weswegen ich Quecksilber nahm. Das obere Ende der Bakteriensäule ist gleichfalls nie mikroskopisch *ganz* scharf zu bekommen, obwohl man eine genügende Schärfe mit der Zeitdauer wirksamer Zentrifugierung erhalten kann. Der dadurch bedingte Fehler

der Ablesung beträgt im Maximum $\pm$ 0,05 mm. Meistens ist er kleiner. Wichtig ist es, die Zentrifuge lange auslaufen zu lassen und nicht zu bremsen!

Eine andere mögliche Fehlerquelle wäre in der Ungleichheit der Capillarenweite gegeben. Füllt man die Capillaren vorher mit Quecksilber und wiegt das Quecksilber, was verschiedenen Längen entspricht, genau (bei gleicher Temperatur, anderenfalls Korrektur wegen Ausdehnung), so muß man bei Division durch die Länge die gleiche Zahl pro Längeneinheit erhalten. Man wird stets Capillaren finden, die dieser Forderung genügend entsprechen.

Bei sehr dichter Bakterienaufschwemmung kann die Länge der Bakteriensäule so groß werden, daß ihre Gesamtlänge selbst bei schwachen Vergrößerungen die Länge des Mikrometermaßstabes überschreitet. In solchen Fällen wird man entweder die Bakteriensuspension entsprechend verdünnen oder aber sich mit einer einfachen Messung an einem guten Maßstab begnügen, der in halbe Millimeter eingeteilt ist und $^1/_{10}$ Millimeter zu schätzen gestattet. Letztere einfache Art der Messung lag dem Versuch in obiger Tabelle zugrunde.

Der bereits obenerwähnte zweite Nachteil dieses Verfahrens ist, daß sich die Rechnung nicht auf stäbchenförmige Bakterien ohne weiteres übertragen läßt, denn hier hat man Gebilde, deren Aneinanderlagerung im engsten Raum sich mathematisch nicht fassen läßt, besonders wenn noch hinzukommt, daß viele Stäbchen peritrich begeißelt sind. Trotzdem wird man auch hier bei Anwendung der gleichen Methode und einigen willkürlichen Annahmen zu zwei Werten gelangen können, von denen der eine das sichere denkbare Maximum ist, der andere das wahrscheinliche Minimum, Werte, die, wenn sie auch sicher der wahren Keimzahl nicht entsprechen können, doch den Vorteil haben, jederzeit leicht reproduzierbar zu sein, und somit die Möglichkeit bieten, eine Suspension der betreffenden Keime bzw. der Trübung zu standardisieren.

Betrachten wir zunächst stäbchenförmige Bakterien ohne Geißeln und nehmen das Stäbchen als ein Zylinder von m cm Dicke und n cm Länge, also mit dem Inhalt $\frac{m^2 \pi \cdot n}{4}$ ccm, so ergäbe sich bei maximaler Packung unter der Annahme völliger Deformierbarkeit unter Verdrängung der gesamten Suspensionsflüssigkeit

$$Z_{\max} = \frac{4 r^2 \cdot h}{m^2 \cdot n} \quad \text{und} \quad x_{\max} = \frac{h}{H} \cdot \frac{4}{\pi m^2 \cdot n} .$$

Unter der Annahme, daß keine Deformierung stattfindet, entsteht die Frage: Wieviel Zylinder von m cm Dicke und n cm Länge ($n > m$) kann man maximal in den Raum $\pi r^2 h$ packen? Offenbar so viel Schichten, als n in h enthalten ist, also $\frac{h}{n}$ Schichten. In jeder Schicht, wobei auch

hier wie bei den Kugeln die Randzone des Zylinders vernachlässigt wird, berührt 1 Zylinder 6 andere. Die Tangentialebenen bilden ein reguläres 6kantiges Prisma mit dem Rauminhalt $\frac{m^2 \cdot n}{2}\sqrt{3}$; die Gesamtzahl dieser Prismen in dem Raum $\pi r^2 h$ ist dann $Z = \frac{2\pi r^2 \cdot h}{n \cdot m^2 \sqrt{3}}$. Die weitere Rechnung ergibt dann $x_{\min} = \frac{h}{H} \cdot \frac{2}{n \cdot m^2 \sqrt{3}}$.

Als Beispiel diene eine Suspension von Shiga-Ruhrbacillen, deren durchschnittliche Länge $n = 30 \cdot 10^{-5}$ cm und Breite $m = 5 \cdot 10^{-5}$ cm angenommen wird.

Von der Suspension wurden mehrere Verdünnungen gemacht, die sowohl errechnet als auch nach obigem Zentrifugierverfahren gemessen wurden, mit dem Ergebnis folgender Tabelle:

Verdünnung der Shiga-Bacillen-suspension	h cm	H cm	$\frac{h}{H}$	$x_{\max}$ × 10^9	$x_{\min}$ × 10^9	x Mittel-wert × 10^9	x berechnet aus der Verdünn. von Keimzahl 54,7 × 10^9	Abweichung d. Keimzahlen in % der errechneten Keimzahl
unverdünnt	0,31	9,05	0,0342	57,79	52,35	55,0	54,7	0,5
1 : 1,16	0,28	9,60	0,0291	49,17	44,52	46,8	47,1	0,6
1 : 1,4	0,21	9,45	0,0222	37,51	33,96	35,7	39,0	8,5
1 : 2	0,16	9,46	0,0169	28,56	25,85	27,2	27,3	0,3
1 : 4	0,08	10,25	0,0078	13,18	11,95	12,5	13,6	8,0
1 : 8	0,04	9,37	0,0042	7,09	6,42	6,7	6,8	1,4

Der Berechnung wurde der Mittelwert aus folgenden mit der unverdünnten Suspension erhaltenen Messungen zugrunde gelegt:

$h =$ 0,33	0,34	0,32	0,33	0,31
$H =$ 9,50	10,05	9,8	9,45	9,05
$\frac{h}{H} =$ 0,0347	0,0338	0,0326	0,0349	0,0342

$$\text{Mittelwert von } \frac{h}{H} = 0{,}0340,$$
$$\text{Mittelwert von } x = 54{,}7 \cdot 10^9.$$

Nach der Wrightschen Methode war der Mittelwert (aus den Messungen 47; 60; 50 × 10^9) $x = 54 \times 10^9$.

Die Tabelle zeigt, daß auch hier die Reproduzierarbeit des Verfahrens mit einem Fehler unterhalb von 10% möglich ist, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß mit Ausnahme der unverdünnten Suspension die Messungen nur einmal ausgeführt wurden. Die gute Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Messung nach *Wright* ist wohl nur Zufall und in der etwas willkürlichen Wahl der Durchschnittsmaße eines Shiga-Bacillus begründet.

Bei begeißelten Bakterien ist eine Volumvermehrung dadurch gegeben, daß bei peritricher Begeißelung alle Geißelfäden (von denen die meisten beim Zentrifugieren abreißen) eine gewisse Menge der Suspensionsflüssigkeit capillar festhalten. Solche Bakterien sind demnach von einer größeren Wasserhülle umgeben, als der bloßen Benetzung ihres Zelleibes entspricht.

Nehmen wir an, daß durch das Volumen des Geißelapparates das eigentliche Bakterienvolumen um fast die Hälfte zunimmt, so entspricht dies ungefähr einer Zunahme des Radius und der Höhe um je $^1/_7$, denn aus der Gleichung: $\pi r^2 h \cdot (1 + x) = \pi \cdot \left(r + \frac{r}{7}\right)^2 \cdot \left(h + \frac{h}{7}\right)$ ergibt sich die Volumenzunahme: $x = 0{,}49$.

Das Bacterium habe m cm Dicke und n cm Länge, dann ist demnach sein Volumen mit dem Geißelapparat:

$$v = \pi \cdot \left(\frac{m}{2} + \frac{m}{14}\right)^2 \cdot \left(n + \frac{n}{7}\right) = \pi m^2 n \cdot 0{,}373 .$$

Also für x_{max} folgt: $x_{max} = \frac{\pi r^2 h \cdot 10^9}{\pi r^2 H \cdot v} = \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{m^2 n} \cdot 0{,}854 .$

Zur Berechnung von x_{min} ist zunächst festzustellen, wieviel Zylinder vom Volumen v sich in den Raum $\pi r^2 h$ maximal ohne Deformierung packen lassen. Auf der Grundfläche πr^2 lassen sich so viele Zylinder vom Vol v aufstellen, als das der Grundfläche $\pi \left(\frac{m}{2} + \frac{m}{14}\right)^2$ des Bakterienzylinders umschriebene reguläre Sechseck in πr^2 enthalten ist. Da der Flächeninhalt dieses Sechsecks $= \frac{32}{49} m^2 \sqrt{3}$ ist, so ist die gesuchte Zahl $\frac{\pi r^2 \cdot 49}{32 \cdot m^2 \sqrt{3}}$. Es gibt nun so viele Bakterienschichten, als die Höhe $\left(n + \frac{n}{7}\right)$ des Bakterienzylinders in h enthalten ist, also $\left(\frac{7h}{8n}\right)$ Schichten. Demnach ist die Gesamtzahl der Bakterien im Volumen $\pi r^2 h$

$$Z_{min} = \frac{7h}{8n} \cdot \frac{\pi 49}{32\sqrt{3}} \cdot \frac{r^2}{m^2} ,$$

und durch Umrechnung auf das Flüssigkeitsvolumen $\pi r^2 H$ ergibt sich:

$$x_{min} = \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{n \cdot m^2} \cdot \frac{7 \cdot 49}{8 \cdot 32 \cdot \sqrt{3}} = \frac{h}{H} \frac{1}{n \cdot m^2} \cdot 0{,}774 .$$

Als Beispiel diene eine Suspension von Typhusbacillen, deren Durchschnittsmaße $n = 22 \cdot 10^{-5}$ cm und $m = 5 \cdot 10^{-5}$ cm angenommen seien. Die Bakteriensuspension wurde wechselnd verdünnt und die Keimzahl jeder Verdünnung nach obigem Zentrifugierverfahren gemessen und auch aus der Verdünnung berechnet. Die Resultate zeigt die folgende Tabelle:

Verdünnung der Typhusbacillensuspension	h cm	H cm	$\frac{h}{H}$	x_{max} $\times 10^9$	x_{min} $\times 10^9$	x Mittelwert $\times 10^9$	Berechnung aus der Verdünn. von Keimzahl 87,8 × 10^9	Abweichung d. Keimzahlwerte in % d. errechn. Keimzahl
unverdünnt	0,24	9,58	0,0250	38,75	35,00	36,8	37,3	1.3
1 : 1,16	0,23	9,57	0,0240	37,20	33,60	35,4	32,1	10,2
1 : 1,4	0,20	10,25	0,0195	30,22	27,30	28,7	26,6	7,8
1 : 2	0,13	9,55	0,0136	21,08	19,04	20,0	18,6	7,5
1 : 4	0,06	9,72	0,00617	9,56	8,63	9,0	9,3	3,2
1 : 8	0,03	9,90	0,00303	4,69	4,24	4,4	4,6	4,3

Der Berechnung wurde der Mittelwert aus folgenden mit der unverdünnten Suspension erhaltenen Messungen zugrunde gelegt:

$h = 0{,}25$	0,23	0,24	0,25
$H = 9{,}81$	9,15	9,58	9,72
$\frac{h}{H} = 0{,}0254$	0,0251	0,0250	0,0257

Mittelwert: 0,0253.

Daraus mittlere Keimzahl: 37,3 × 10^9.

Das Wrightsche Verfahren ergab aus folgenden Werten:

42,6; 62,5; 50,8; 37,3; 42,5; 48,7 × 10^9 den Mittelwert 47,4 × 10^9.

Wir sehen, daß bei der Anwendung meines Zentrifugierverfahrens bei Typhusbakterien der auf die aus der Verdünnung errechnete Keimzahl bezogene prozentuale Unterschied der gemessenen Keimzahl zwar größer ist als bei den Staphylokokken, daß aber immerhin eine Reproduzierbarkeit innerhalb 10% Fehler gewährleistet ist. Die Unstimmigkeit mit den nach *Wright* erhaltenen Werten liegt zunächst in der etwas willkürlich angenommenen Durchschnittsgröße der bekanntlich ziemlich variabeln Typhusbacillen und in der willkürlichen Verrechnung des Geißelvolumens. Andererseits haften aber der Wrightschen Keimzahlbestimmung so viele objektive und durch die schwierige Technik bedingte subjektive Fehler an, daß ich allein schon deswegen für den Laboratoriumsgebrauch meinem Verfahren den Vorzug geben möchte.

In der eingangs zitierten Arbeit von *Dold* wird mit Recht betont, daß der Antigen- und Heilwert eines Vaccins nicht durch die Angabe der Keimzahl allein dargestellt wird. Trotzdem werden nach wie vor bei der Herstellung von Vaccinen die Keimzahlen zu berücksichtigen sein. Da sich diese niemals *genau* angeben lassen, so käme für eine eventuelle Standardisierung von Vaccinen nur ein Verfahren in Betracht, das sich einmal genau genug reproduzieren läßt, und das sich andererseits leicht zu einem konventionellen Maßsystem ausbauen ließe.

Ich glaube, daß das oben skizzierte Verfahren einem solchen Zwecke dienlich sein kann, wenn es für die in Betracht kommenden Bakterien im einzelnen weiter ausgebaut würde.

(Aus dem Wissenschaftlichen Laboratorium im Vincenz-Krankenhaus, Berlin-Lichterfelde.)

Über Desinfektionsmittel und die Abhängigkeit ihrer Wirkung von den Lösungsmitteln.

Ein Beitrag zum Mechanismus der Desinfektion, zur Kombination von Desinfektionsmitteln und zur Methodik bei deren Prüfung.

Von

Otto Ornstein.

Das Studium der Desinfektionswirkungen ist seit *Robert Kochs* grundlegenden Arbeiten Gegenstand erfolgreicher Bemühungen der Forscher gewesen und hat sowohl in der Methodik der Prüfung, vor allem seit den Versuchen von *Paul* und *Krönig*, als auch in der systematischen Aufsuchung von wirkungsvollen Kombinationen, insbesondere unter den Bedingungen der inneren Desinfektion bei Infektionskrankheiten, seit dem Studium der cyclischen Arsenverbindungen durch *Ehrlich*, der Chininderivate und Acridiniumverbindungen durch *Morgenroth* eine große Bereicherung erfahren.

Bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln steht die Feststellung des reinen Wirkungswertes gegen Mikroben und Sporen im Vordergrund. Bei den chemotherapeutischen Mitteln hat man in der Erwägung, daß ihr Wert sich erst im Tierversuch erweisen läßt, im allgemeinen darauf verzichtet, absolute Werte im Reagensglas zu ermitteln.

Nun sind in dem besonders von *Ehrlich* klassisch vertretenen Zusammenhange zwischen „chemischer Konstitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung“ bekanntlich der physikalische Zustand eines Mittels in der Lösung, seine Lipoidlöslichkeit, sein Diffusionsvermögen und ähnliche Eigenschaften von wesentlicher Bedeutung. Während man nun zur Beurteilung von Desinfizientien, je nach dem Anwendungszweck, neben dem reichen Wirkungswert auch die Lösungsmittel bzw. die Lösungsbedingungen heranzog, und zwar mit Rücksicht auf die aus dem chemischen Lösungsverhalten der Desinfektionsmittel sich ergebenden Momente, wurden bei der Prüfung der Chemotherapeutika, insbesondere der hochmolekularen Verbindungen der Chinin- und Farbstoffgruppen, die Lösungsbedingungen in vitro und in vivo im allgemeinen weniger berücksichtigt; hier wollte man vielmehr unter dem Gesichtspunkte spezifischer ätiotroper Wirkungen „durch Versuche in vitro

sichere Anhaltspunkte dafür gewinnen, ob ein Stoff zu chemotherapeutischen Versuchen bei einer bestimmten Infektion überhaupt in Frage komme." (*Schiemann* und *Ishiwara* a. a. O.)

Über den Einfluß des Mediums auf die Wirkungsweise von Desinfektionsmitteln liegen Untersuchungen vor an den Chemotherapeutica Äthylhydrocuprein (Optochin), Salvarsan und Trypaflavin, sowie an Sublimat und Phenol. *Schiemann* und *Ishiwara*[1]) fanden bei ihren Untersuchungen über die elektive Wirkung des Salvarsans gegen Milzbrand-, Rotlauf- und Rotzbacillen, des Äthylhydrocupreins auf Pneumokokken, daß die Wirkung in vivo derjenigen in vitro etwa entspricht, und in Serum annähernd so stark wie in Bouillon, in aktivem Serum (und zwar Kaninchenserum, nicht Rinderserum) besser als in inaktivem sich äußert, während Sublimat das umgekehrte Verhalten zeigt. Phenol zeigt keine wesentliche Abschwächung. *Schiemann* und *Ishiwara* deuten ihre Befunde aus der verschiedenen Rolle, welche die labilen Serumstoffe (Lipoide bzw. Lipoideiweißstoffe?) bei der Desinfektion in vivo einerseits mit Salvarsan und Äthylhydrocuprein und anderseits mit Sublimat spielen. Versuche, diese Annahme durch Cholesterin- und Lecithinzusätze in vergleichenden Desinfektionsreihen zu bestätigen, gelangen allerdings nicht eindeutig. Im allgemeinen wirkten die Mittel nach ihrer Konzentration und benötigten nur bei außerordentlichen Variationen der Einsaaten (1 bis 1 : 1 000 000) eine Steigerung der Konzentrationen um das Drei- bis Zehnfache. Hierin ergab sich kein Unterschied zwischen Salvarsan, Sublimat und Phenol. „Demgegenüber wird auf das andersartige Verhalten der spezifischen Immunstoffe des Serums verwiesen, welch letztere offenbar in geeigneten Medien (und zwar bei Ansatz der Systeme in Kochsalzlösung) eine weit stärkere (quantitativ abgrenzbare) Affinität zu den antigenen Bakterien besitzen als die untersuchten chemotherapeutischen Präparate."

Schiemann und *Baumgarten*[2]) haben gefunden, daß Trypaflavin in seiner Wirkung durch die bactericide Kraft frischen Serums eine Verstärkung erfährt. Die Beziehung dieser Kombinationswirkung zur Alkalescenz des Serums wollen die Autoren dahingestellt sein lassen und verweisen dabei auf die natürliche Bactericidie einiger Serumarten (z. B. des Rattenserums gegen Milzbrandbacillen), welche *von Behring* aus deren hoher Alkalescenz erklärte, sowie auf Untersuchungen von *Michaelis*[3]), in welchen die Bedeutung der OH-Ionenkonzentration für die Wirkung der Chinaalkaloide festgestellt wurde. Die Autoren sehen darin nicht den Ausdruck einer allgemeinen Regel, da sich z. B. Staphylokokken anders verhalten als Colibacillen.

Eisenberg und *Okolska*[4]) fanden bei Lösungen von Sublimat in destilliertem Wasser, daß mit Steigerung der Einsaat von Typhusbacillen im Verhältnis 1 : 10 : 100 die zur Abtötung innerhalb 2 Stunden erforderlichen absoluten Mengen an Desinfektionsmitteln sich etwa wie 1 : 2 : 16 verhielten. Hier tritt eine Annäherung an quantitativ abgrenzbare Affinitäten zwischen Bakterien und Desinfektionsmittel zutage, welche sich aus dem Fehlen von Kolloiden, insbesondere Eiweiß im Medium erklärt, für welches $HgCl_2$ eine besondere Affinität besitzt.

Die starke Giftwirkung minimaler Konzentrationen des Quecksilbersalzes bei langer Einwirkungszeit (*Schiemann* und *Ishiwara* u. a.) erinnert nach *Hailer*[5])

[1]) Zeitschr. f. Hyg. **77**. 1914.

[2]) Zeitschr. f. Hyg. **97**. 1923.

[3]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref. **73**. 1922.

[4]) Zentralbl. f. Bakteriol. **69**.

[5]) Weyls Handbuch der gesamten Hygiene Bd. VIII, S. 1043.

„an das unverhältnismäßig kräftige Keimtötungsvermögen sehr geringer Konzentrationen von gewissen Chininabkömmlingen und macht wie dieses eine Bindung des vermutlich kolloidal gelösten Giftes durch elektive Adsorption oder in diesem Falle auch infolge einer annähernd stöchiometrisch verlaufenden chemischen Reaktion wahrscheinlich".

Nach dem Gesagten erscheint der Einfluß der Lösungsbedingungen und Lösungsmittel auf die quantitativen Bindungsverhältnisse der Desinfektionsmittel und deren Wirkung von ähnlicher Bedeutung wie für die Bindungsverhältnisse zwischen Antigenen und Antikörpern, worauf später zurückzukommen sein wird. Den Einfluß verschiedener Lösungsbedingungen und Lösungsmittel auf die Wirkung von Desinfektionsmitteln zu untersuchen und die so gewonnenen Sachverhalte theoretisch und praktisch auszuwerten, erscheint demnach sehr erwünscht.

Die im folgenden mitgeteilten Versuche gingen aus von Untersuchungen über den Einfluß der elektrolytischen Spaltung von Salzen auf Keimsuspensionen im elektrischen Gleichstrom zwischen im Potential aufeinander abgestimmten Diaphragmen[1]). Deren Ergebnisse machten eine eingehendere Prüfung der Desinfektionswirkungen von Alkalihydraten, anorganischen Säuren und Salzen wünschenswert, welche verhältnismäßig wenig bearbeitet worden sind, obwohl systematische Untersuchungen deren Anwendbarkeit theoretisch durchaus über den jetzigen Bereich hinaus möglich erscheinen lassen.

Diese einfachsten Wirkungen und Kombinationen wurden in wässerigen Lösungen, und zwar auch in Gegenwart von Serum und reinem Eiweiß geprüft.

Zu diesen einfachsten Kombinationswirkungen in wässerigen Lösungen kommen dann Versuche über die Beeinflussung der Wirkung bekannter Desinfektionsmittel in den verschiedenen, mehr oder weniger selbst schon wirksamen, einfachen oder zusammengesetzten Lösungsmitteln.

Die Technik der Desinfektionsversuche könnte sich für die zu ermittelnden Sachverhalte auf Suspensionsversuche beschränken. Es wurden die gleichen Desinfektionsmittel unter den verschiedenen Lösungsbedingungen gleichzeitig, und zwar bei Zimmertemperatur geprüft, so daß die Beziehung zwischen Konzentration und keimtötender Wirkung bei langsamem Verlauf der Wirkung klar zutage trat und die etwa mögliche Mitübertragung von Desinfektionsmitteln bei der Bakterienaussaat als gleichmäßige Fehlerquelle wohl vernachlässigt werden konnte.

Die Absterbeordnungen wurden in den Tabellen 1—12 in längerer Beobachtungsreihe von sofortiger Aussaat bis zu einer solchen nach 7 bis 10 Tagen aufgestellt. Die ermittelten Keimzahlen wurden dabei

[1]) Siehe auch *Ruppel* und *Ornstein*, Zeitschr. f. Hyg. **99**. 1923.

durch Schätzung auf die Gesamteinsaat notiert und mit 4—1 bezeichnet, bei weniger als ein Viertel der Einsaat (kleiner als 1) auf Tausende und Hunderte geschätzt. In vielen Versuchen wurden die Keime ausgezählt oder die Menge vergleichend bestimmt.

In den Versuchen von Tab. 13 an wurden vielfach flüssige Nährböden verwendet und nach 24, 48 und gelegentlich auch nach 72 Stunden im Endversuch abgelesen, im allgemeinen aber die Aussaaten unter Zugrundelegung der Bouillonkontrolle in Agarplatten ausgezählt.

Als Testkeime wurden überwiegend Colibacillen und Staphylokokken verwendet.

Die Auswahl der Salze, Alkalien und Säuren erfolgte mit einiger Rücksicht auf die physiologischen Verhältnisse im Serum, die der Desinfektionsmittel besonders mit Rücksicht auf deren Anwendung in der Therapie.

Desinfektionswirkung der Kombinationen von Säuren und Alkalien mit Neutralsalzen.

Über den Einfluß des Salzzusatzes auf die Wirkung einbasischer Säuren gegen Bakterien liegen nur wenige Feststellungen vor (*Hailer*, Weyls Handbuch der Hygiene). Die Beeinflussung der sporiciden Kraft von Säuren in stärkerer Lösung ($^{n}/_{10}$ bis $^{n}/_{4}$) durch NaCl-Zusätze und salpetersaure Salze in drei- bis vierfach normaler Lösung (*Gegenbauer* und *Reichel*, *Hailer*) ist sowohl von praktischer Bedeutung für die Desinfektion milzbrandiger Häute und Felle als auch zur Kenntnis der Wirkungsweise von Säuren wertvoll, indem „die Desinfektionskraft von starken einbasigen Säuren durch Salzzusatz so erhöht werden kann, daß ganz schwache, für das Substrat ganz unschädliche Konzentrationen unter Umständen anwendbar werden“. Im allgemeinen ist dabei Voraussetzung, daß Salze mit gleichem Anion zur Kombination mit Säuren verwendet werden. Bei Verwendung von Säuren und Salzen mit verschiedenen Anionen treten Unregelmäßigkeiten auf. Doch läßt sich durch „Zusatz passend gewählter Salze zu schwachen, an sich unwirksamen Säurelösungen die Wirkung bei nur schwach saurer Reaktion ganz erheblich erhöhen; vielleicht ließe sich, namentlich bei der Wundbehandlung, von diesem Verhalten der noch sehr wenig benutzten stark bactericiden Säuren ein passender Gebrauch machen“ (*Hailer*). Die Wirkung solcher Kombinationen wird erklärt durch die Steigerung oder Verminderung des Quellungsvermögens des H-Ions durch das Säureanion bzw. durch die Ionen zugesetzter Salze, indem Säuren den Quellungsdruck hydrophiler Kolloide steigern, Alkalisalze entsprechend der „lyotropen Reihe“ entquellend wirken und schon bei geringen Säurekonzentrationen zu irreversiblen Fällungen führen.

Auch der „Zusatz von Kochsalz zu Natriumhydroxyd erhöht bei kleinen Salzzugaben das Keimtötungsvermögen des Alkalis und verrin-

gert es bei steigenden bis zur Unwirksamkeit" (*Hailer*), wenigstens soweit die sporicide Wirkung in Frage kommt. Die Einwirkung von Salzzusätzen zu geringen Alkalihydratkonzentrationen scheint systematisch nicht untersucht worden zu sein; „vermutlich wird das Quellungsvermögen des gelösten Alkalis bei kleinen Salzzusätzen größer, durch hohe aber herabgesetzt" (*Hailer*). Wie Alkalien wirken auch Carbonate und tertiäre Phosphate, auch diese werden in ihrer Wirkung durch Zusatz von Neutralsalzen verstärkt; Versuche in dieser Richtung sind anscheinend nicht systematisch angestellt worden.

Den neutralen Alkalisalzen kommt im allgemeinen keine für die praktische Anwendung ausreichende keimtötende Wirkung zu. Entsprechend ihrem Entquellungsvermögen ordnen sie sich nach der „lyotropen Reihe", in welcher die Halogenverbindungen mit in der untersten Reihe hinsichtlich ihrer entquellenden Wirkung rangieren, d. h. am schwächsten wirken. In diesem Zusammenhange muß auch der Nachweis der antagonistischen Wirkung der verschiedenwertigen Salze gegen befruchtete Funduluseier (*J. Loeb*) erwähnt werden, nach welchem reine Salzlösungen giftiger wirken als die eines Gemisches mehrerer Elektrolyte, in welchem sich die entquellenden Wirkungen der Kationen ausgleichen.

NaCl gehört zu den das Bakterienwachstum am wenigsten unterbindenden Salzen (*Hailer*). Bei seiner Bedeutung in der medizinischen Praxis der Lösungen, insbesondere für parenterale Applikation, ist ihm bei den folgenden Untersuchungen besondere Bedeutung beigemessen worden. Auch die Komponenten der Ringerlösung, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$ NaH_2PO_4 sind in die Untersuchungen einbezogen worden und ließen besonders eindrucksvoll ihren Einfluß auf die Desinfektion hervortreten, worauf nachher zurückzukommen sein wird.

Versuche über den Ablauf der Wirkungssteigerung der keimtötenden Kraft normaler NaOH-Lösungen durch entsprechende NaCl- und NaF-Lösungen.

Es wurden zu diesem Zwecke fallende Konzentrationen von normaler, zehntel-, hundertstel normaler NaOH-Lösungen reihenweise normal, zehntel- und hundertstel normal besalzen und zu 5 ccm mit je 0,1 einer 24stündigen Colibouillonkultur beimpft, in anderen Ansätzen auch mit Staphylokokken (Tab. 1 und 2). Bei sofortiger Aussaat, sowie nach 20 Minuten, einer Stunde, 4,24 und 7 × 24 Stunden zeigte sich im ganzen übereinstimmend schon nach 20 Minuten bis einer Stunde eine gleichsinnige desinfizierende Wirkung im Sinne einer Verstärkung der Alkalihydratwirkung durch die stärkeren Salzkonzentrationen. Innerhalb der ersten Stunde dagegen traten bei einigen Versuchen Einschränkungen der Alkaliwirkung insofern zutage, als bei relativ kleinen und relativ großen Salzzusätzen in bezug auf die jeweils verwendete Natronlauge-

Tabelle 1.

Desinfektionswirkung abgestufter NaOH- und NaCl-Konzentrationen und Beeinflussung der Desinfektionswirkung der NaOH- durch NaCl-Zusätze auf Colibacillen.

Lösungskonzentration		Aussaat nach					
NaCl	NaOH	d. Beimpf.	20 Min.	60 Min.	240 Min.	24 Std.	7×24 Std.
n	n	·	·	·	·	·	·
	n/10	< 1	1000 ×	1000 ×	200	·	·
	n/100	> 1	> 1	1000 ×	1000 ×	·	·
	Aqua dest.	2	2	> 2	2	1	4
n/10	n	·	·	·	·	·	·
	n/10	> 1	> 1	> 1	100 ×	·	·
	n/100	2	2	2	< 2	1000 ×	·
	Aqua dest.	3	3	4	4	3	4
n/100	n	·	·	·	·	·	·
	n/10	< 4	> 2	> 1	< 1	1000 ×	4
	n/100	< 4	> 2	> 2	> 1	1	4
	Aqua dest.	4	4	> 2	4	4	4
Aqua dest.	n	·	·	·	·	·	·
	n/10	< 4	> 2	> 1	< 1	1	< 1
	n/100	< 4	> 2	> 2	> 1	< 1	4
	Aqua dest.	< 4	4	< 3	4	2	4

Einsaat: 0,1 ccm Colibouillonkultur in 10 ccm der verschiedenen Lösungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 500 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

500 000 = 4
250 000 = 2
125 000 = 1
< 60 000 = 1000 × sc. Tausende,
100 × sc. Hunderte.

Ergebnis: NaCl ist auch in der höchsten angewandten Konzentration gegen Colibacillen praktisch wirkungslos. n-NaOH wirkt sehr stark und momentan, n/10 nur unbeträchtlich.

Bei Kombination steigender NaCl- mit steigenden NaOH-Konzentrationen tritt eine gleichsinnige Verstärkung der Lauge durch Kochsalz hervor. Sogar bei sehr schwachen Konzentrationen von NaOH erfolgt auf mittlere Kochsalzzusätze eine sehr starke Desinfektionswirkung, die sich gelegentlich allerdings nur als Entwicklungshemmung äußert.

konzentration eine, wenn auch vorübergehende Desinfektionshemmung zutage trat, und zwar gegen Colibacillen ausgesprochener als gegen Staphylokokken. Kontrollen mit reinen NaOH-Lösungen sowie mit reinen Salzlösungen in destilliertem Wasser ließen sowohl die in der ersten Stunde beobachteten Desinfektionshemmungen als auch das spätere mit der Konzentration beider Komponenten gleichsinnige Fortschreiten der Desinfektionswirkung deutlich erkennen. Im allgemeinen waren mitt-

Tabelle 2.

Desinfektionswirkung abgestufter NaOH- und NaCl-Konzentrationen und Beeinflussung der Desinfektionswirkung der NaOH- durch NaCl-Zusätze gegen Staphylokokken.

Lösungskonzentration		Aussaat nach					
NaCl	NaOH	d. Beimpf.	20 Min.	60 Min.	800 Min.	24 Std.	7×24 Std.
n	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{100}$	2	< 1	1000 ×	100 ×	10	·
	Aqua dest.	4	4	4	4	< 4	4
$^n/_{10}$	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{100}$	3	> 2	2	2	> 1	< 4
	Aqua dest.	4	4	4	4	4	4
$^n/_{100}$	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{100}$	3	3	> 2	> 2	2	< 4
	Aqua dest.	4	4	4	4	4	4
Aqua dest.	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{100}$	4	3—4	3	3	2	< 4
	Aqua dest.	4	4	4	4	4	4

Einsaat: 0,1 ccm *Staphylokokken*bouillonkultur in 5 ccm der verschiedenen Lösungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 1 000 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

1 000 000 = 4
500 000 = 2
250 000 = 1
< 125 000 = 1000 × sc. Tausende
100 × sc. Hunderte.

Ergebnis: Die Desinfektionswirkung der NaCl-Lösungen auf Staphylokokken ist wie auf Colibacillen praktisch bedeutungslos; dagegen wirkt NaOH auch noch in der Konzentration $^n/_{10}$ sehr stark und augenblicklich, $^n/_{100}$ nur unbeträchtlich.

Die Kombination von NaCl und NaOH ergibt eine Steigerung der Desinfektionswirkung auf Staphylokokken, jedoch nicht in dem Maße wie bei Colibacillen.

lere Salzzusätze zu hohen Alkalihydratverdünnungen ($^n/_{10}$ NaCl und $^n/_{100}$ NaOH) noch recht wirksam.

Bei Versuchen, in welchen neben NaOH verschiedene Konzentrationen von NaF in Wirkung gesetzt sind, erscheinen die Hemmungen während der ersten Stunde in den höheren Salzkonzentrationen besonders deutlich ausgesprochen, infolge der verhältnismäßig geringen Empfindlichkeit der gramnegativen Mikroben gegen Fluorid (*Hailer*, Weyls Handbuch); während die mittleren und kleinen eine deutliche Verstärkung der Desinfektionswirkung aufweisen. Nach einer Stunde stellt

sich die verstärkende Salzwirkung wieder gleichsinnig mit der Konzentration ein. Beim Fluorid sind mittlere Salzzusätze zu mittleren Alkalihydratverdünnungen ($^n/_{10}$ NaF und $^n/_{10}$ NaOH) besonders wirksam (Tab. 3).

Besonders stark treten die Desinfektionshemmungen bei den gegen Natriumfluorid ungleich empfindlicheren grampositiven Staphylokokken

Tabelle 3.
Desinfektionswirkung abgestufter NaOH- und NaCl-Konzentrationen und Beeinflussung der Desinfektionswirkung der NaOH- durch NaF-Zusätze gegen Colibacillen.

Lösungskonzentration		Aussaat nach					
NaF	NaOH	d. Beimpf.	20 Min.	60 Min.	240 Min.	24 Std.	7×24 Std.
n	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	>2	<1	100 ×	·	·	·
	$^n/_{100}$	>2	>2	1000 ×	200	·	·
	Aqua dest.	4	4	4	4	1000 ×	·
$^n/_{10}$	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	100 ×	·	·	·	·	·
	$^n/_{100}$	3	<2	>1	100 ×	·	·
	Aqua dest.	4	4	4	4	4	4
$^n/_{100}$	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	1000 ×	50	·	·	·	·
	$^n/_{100}$	3	>2	<1	100 ×	·	·
	Aqua dest.	4	4	4	4	3	>4
Aqua dest.	n	·	·	·	·	·	·
	$^n/_{10}$	<1	100 ×	20	·	·	·
	$^n/_{100}$	>3	>2	>1	1000 ×	·	·
	Aqua dest.	4	4	4	4	3	>4

Einsaat: 0,1 ccm *Coli*bouillonkultur in 10 ccm der verschiedenen Lösungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 500 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

$$
\begin{aligned}
500\,000 &= 4 \\
250\,000 &= 2 \\
125\,000 &= 1 \\
< 60\,000 &= 1000 \times \text{ sc. Tausende,} \\
& 100 \times \text{ sc. Hunderte.}
\end{aligned}
$$

Ergebnis: NaF wirkt im Gegensatz zu NaCl in den höchsten angewandten Konzentrationen (*n*) schon schwach desinfizierend, aber erst nach 24stündiger Einwirkung.

In Kombination mit NaOH wirkt NaF bedeutend stärker und nachhaltiger als NaCl; dagegen treten während der 1. Stunde der Einwirkung hoher NaF-Konzentrationen in mittleren NaOH-Konzentrationen Hemmungen der Desinfektionswirkung gegen Colibacillen zutage.

in Erscheinung, und zwar zuerst in den $^{n}/_{10}$ NaOH-Konzentrationen, wo sie sich nach vier Stunden ausgleichen; bald aber auch, und bis zu Ende anhaltend, in den $^{n}/_{100}$ NaOH-Lösungen, in welchen mittlere und kleine NaF-Zusätze, welche an sich schon stark abtöten, die gegen Staphylokokken geringe Desinfektionswirkung der Lauge nur wenig verstärken, die NaF-Wirkung aber durch Lauge geradezu gehemmt wird; während große Fluoridmengen die geringe NaOH-Wirkung am wirksamsten verstärken (Tab. 4).

Tabelle 4.

Desinfektionswirkung abgestufter NaOH- und NaF-Konzentrationen und Beeinflussung der Desinfektionswirkung der NaOH- durch NaF-Zusätze gegen Staphylokokken.

Lösungskonzentration		Aussaat nach					
NaF	NaOH	d. Beimpf.	20 Min.	60 Min.	240 Min.	24 Std.	7×24 Std.
n	n	7	4	·	·	·	·
	$^{n}/_{10}$	2000	650	540	18	·	·
	$^{n}/_{100}$	>1	1	>2	2	1200	·
	Aqua dest.	2	>1	2	2500	3000	400
$^{n}/_{10}$	n	2	20	·	·	·	·
	$^{n}/_{10}$	>1	1200	1200	5	·	·
	$^{n}/_{100}$	<3	<3	<2	2	2	50
	Aqua dest.	<3	2	3	3000	600	4
$^{n}/_{100}$	n	650	2	3	3	·	·
	$^{n}/_{10}$	>1	1000	300	7	·	·
	$^{n}/_{100}$	4	1	>3	>3	1	<1
	Aqua dest.	2	>3	2	>4	4	800
Aqua dest.	n	13	5	5	2	·	·
	$^{n}/_{10}$	1200	650	7	6	·	·
	$^{n}/_{100}$	>3	>3	<4	>4	2	1
	Aqua dest.	>4	>3	<4	>4	4	1

Einsaat: 0,1 ccm *Staphylokokken*bouillonkultur in 5 ccm der verschiedenen Lösungen des Ansatzes.

Aussaat: 1 Öse in Agargußplatte, entsprechend etwa 20 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

$$20\,000 = 4$$
$$10\,000 = 2$$
$$5\,000 = 1$$

Ergebnis: Die NaF-Wirkung auf Staphylokokken ist im Gegensatz zur NaCl-Wirkung sehr erheblich (wie bekanntlich überhaupt auf grampositive Bacillen) und viel stärker als auf Colibacillen. Bei der Kombination mit NaOH bewirkt also NaF zwar eine geringe Verstärkung in allen Konzentrationen mit hohen und geringen Konzentrationen von NaOH, erfährt aber dabei in mittleren und geringen Konzentrationen selbst eine gewisse Beeinträchtigung seiner Wirkung durch niedrige NaOH-Konzentrationen. Ferner treten in den mittleren NaOH-Konzentrationen während der 1. Stunde deutliche Hemmungswirkungen des NaF zutage.

Versuche über den Ablauf der Wirkungssteigerung von NaOH, Na_2CO_3, Na_3PO_4 und HCl durch NaCl.

Aus der Tabelle 5 ist ersichtlich die schnelle Anfangswirkung der NaOH im Vergleich mit der HCl auf Colibacillen, welche bis zu 24 Stunden anhält, aber nicht die Dauerwirkung der Säure erreicht; auch die verstärkende Salzwirkung tritt bei der Lauge markanter hervor als bei der Säure, welche auf die Dauer auch ohne Salz wirkt.

In Tabelle 6 und 7 sind auch die Salze Na_2CO_3 und Na_3PO_4 zum Vergleich mit NaOH und HCl herangezogen. Auch diese stark alkalischen Salze werden durch NaCl in ihrer Wirkung, zumal Na_3PO_3, wieder anfangs mächtig gefördert; sie zeigen aber nur in den stärkeren Konzentrationen eine Dauerwirkung, indem nach außerordentlicher Keimverminderung unter den gewählten Versuchsbedingungen die wenigen überlebenden Keime sich wieder stark vermehren.

Die bei dieser Gelegenheit mit geprüften Puffersalze Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 sind tabellarisch nicht mit angeführt, da sie mit ihrer schwach

Tabelle 5. *Vergleich des Verlaufes der Desinfektionswirkung von abgestuften, geringen Konzentrationen von Säure (HCl) und Alkali (NaOH), in einfacher wässeriger Verdünnung und in physiologischer NaCl-Lösung, auf Colibacillen.*

Desinfektionsmittel-verdünnung		NaCl 0,85%				Aqua dest.			
		nach Beimpfung	60 Min.	24. Std.	7 mal 24 Std.	nach Beimpfung	60 Min.	24 Std.	7 mal 24 Std.
n-NaOH	0,030	·	·	·	·	·	·	·	·
	0,010	100×	·	·	·	1000×	10	·	1
	0,003	3—4	100×	20	2	4	1	1000×	1
	Aqua dest.	4	4	4	2	4	4	3—4	2
n-HCl	0,030	100×	·	·	·	2	50	—	·
	0,010	1000×	·	·	·	2	50	—	·
	0,003	3—4	1000×	100×	·	3—4	1	1000×	·
	Aqua dest.	4	4	4	2	4	4	3—4	2

Einsaat: 0,1 ccm *Coli*bouillonkultur in 5 ccm der verschiedenen Verdünnungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 2 000 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

2 000 000 = 4
1 000 000 = 2
500 000 =
< 250 000 = 1000 × sc. Tausende
100 × sc. Hunderte.

Ergebnis: NaCl verstärkt sowohl bei Lauge als bei Säure deren reine Desinfektionswirkung auf Colibacillen. NaOH zeigt eine sehr schnelle Anfangswirkung, besonders bei Salzzusatz, und wirkt noch bei 0,003 n sehr stark keimvermindernd. Die Säure HCl zeigt eine zwar langsamere, aber nachhaltigere Wirkung absoluter Desinfektion.

Tabelle 6.

Vergleich des Verlaufes der Desinfektionswirkung von abgestuften, geringen Konzentrationen von n-HCl, n-NaOH und der alkalischen Salze Na_2CO_3 und Na_3PO_4, mit und ohne Zusatz von Kochsalz in physiologischer Lösung, auf Colibacillen.

Lösungsmittel	Desinfiziens	Aussaat nach der Beimpfung	24 Std.	7 mal 24 Std.	Lösungsmittel	Desinfiziens	Aussaat nach der Beimpfung	24 Std.	7 mal 24 Std.
NaCl-Lösung (0,85%)	n-HCl				Destilliertes Wasser	HCl			
	0,030	1	·	·		0,030	2	·	·
	0,010	2	·	·		0,010	2	20	·
	0,003	3	200	·		0,003	3	1	5
	Aqua dest.	4	4	4		Aqua dest.	4	4	4
	n-NaOH					NaOH			
	0,030	·	·	·		0,030	1000 ×	·	·
	0,010	50	·	·		0,010	3	·	·
	0,003	3	·	·		0,003	4	20	1
	Aqua dest.	4	4	4		Aqua dest.	4	4	4
	n-Na_2CO_3					Na_2CO_3			
	0,030	2—3	20	·		0,030	3	50	100 ×
	0,010	3	20	20		0,010	3	1	2
	0,003	4	1	4		0,003	4	3	4
	Aqua dest.	4	4	4		Aqua dest.	4	4	4
	n-Na_3PO_4					Na_3PO_4			
	0,030	1000 ×	·	·		0,030	1000 ×	10	100 ×
	0,010	1	20	2		0,010	3	200	4
	0,003	4	100	3		0,003	4	3	4
	Aqua dest.	4	4	4		Aqua dest.	4	4	4

Einsaat: 0,1 ccm *Coli*bouillonkultur in 10 ccm der verschiedenen Verdünnungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 2 000 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

$$2\,000\,000 = 4$$
$$1\,000\,000 = 2$$
$$500\,000 = 1$$
$$< 250\,000 = 1000 \times \text{ sc. Tausende}$$
$$100 \times \text{ sc. Hunderte.}$$

Ergebnis: Entsprechend dem Ergebnis in Tab. 5 zeigt die Säure eine gleichmäßige, starke desinfektorische Dauerwirkung; die Lauge eine starke Anfangswirkung ohne Nachhaltigkeit in hohen Verdünnungen. Die Salze haben entsprechend ihrem basischen Charakter eine geringe Anfangswirkung, aber keine Dauerwirkung.

Kochsalzzusatz steigert sowohl Säure wie Lauge stark; und auch die alkalischen Salze Na_2CO_3 und Na_3PO_4 erfahren durch NaCl eine kräftige Verstärkung im gleichen Sinne wie die Lauge; nur ist die Desinfektionswirkung, besonders von Na_2CO_3, weit geringer und weniger nachhaltig.

Tabelle 7. *Vergleich des Verlaufes der Desinfektionswirkung von abgestuften, geringen Konzentrationen von n-HCl, n-NaOH und des alkalischen Na_3PO_4, mit und ohne Zusatz von Kochsalz in physiologischer Lösung, auf Staphylokokken.*

Lösungsmittel	Desinfiziens	Aussaat nach der Beimpfung	Aussaat nach 60 Min.	Aussaat nach 24 Std.	Aussaat nach 7 mal 24 Std.	Lösungsmittel	Desinfiziens	Aussaat nach der Beimpfung	Aussaat nach 60 Min.	Aussaat nach 24 Std.	Aussaat nach 7 mal 24 Std.
n/1-NaCl-Lösung (0,85%)	n-HCl					Destilliertes Wasser	HCl				
	0,030	3	50	·	·		0,030	2	·	50	·
	0,010	3—4	100 ×	100 ×	·		0,010	3—4	100 ×	100 ×	·
	0,003	4	1	1	·		0,003	4	1	1	12
	Aqua dest.	4	4	4	4		Aqua dest.	4	4	4	4
	n-NaOH						NaOH				
	0,030	2	100	·	·		0,030	3	2	·	·
	0,010	3—4	2	200	·		0,010	4	3	20	·
	0,003	3—4	3	1000 ×	1		0,003	4	4	200	3
	Aqua dest.	4	4	4	4		Aqua dest.	4	4	4	4
	n-Na_3PO_4						Na_3PO_4				
	0,030	4	1	100 ×	·		0,030	4	3	200	100 ×
	0,010	4	3—4	1	1		0,010	4	4	2	1—2
	0,003	4	4	3	2		0,003	4	4	3—4	3
	Aqua dest.	4	4	4	3—4		Aqua dest.	4	4	4	4

Einsaat: 0,1 ccm *Staphylokokken*bouillonkultur in 10 ccm der verschiedenen Lösungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 2 000 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

$$2\,000\,000 = 4$$
$$1\,000\,000 = 2$$
$$500\,000 = 1$$
$$< 250\,000 = 1000 \times \text{ sc. Tausende}$$
$$100 \times \text{ sc. Hunderte.}$$

Ergebnis: Wie in Tab. 5 und 6 gegen Colibacillen, wirkt die Säure auch gegen Staphylokokken nachhaltiger als die Lauge, deren Anfangswirkung auch nicht so ausgesprochen wie gegen Colibacillen in Erscheinung tritt. Auch bei dem alkalischen Na_3PO_4 tritt die, gegen Colibacillen, zumal bei Salzzusatz, kräftig einsetzende, anfängliche Keimverminderung zurück.

alkalischen bzw. schwachsauren Reaktion sich im Versuch praktisch als Neutralsalz verhielten, d. h. weder allein abtötend oder keimvermindernd noch durch NaCl anders als vorübergehend und ohne Dauerwirkung in diesem Sinne beeinflußt wurden.

Während NaOH gegen Colibacillen, besonders im Anfang der Einwirkung, durch NaCl bedeutender verstärkt wird als Säure, ohne in kleinen Konzentrationen deren Dauerwirkung zu erreichen, tritt gegen Staphylokokken auch die Anfangswirkung der NaOH und deren Verstärkung durch NaCl im Verhältnis zur HCl zurück; entsprechendes Verhalten zeigt auch Na_3PO_4.

Tabelle 8. *Einfluß von Eiweiß auf abgestufte Salz-Lauge-Kombinationen in desinfektorischer Hinsicht.*

Eiweiß-konzentration	Lösungs-mittel	NaOH	Aussaat nach 60 Min.	Aussaat nach 24 Std.	Lösungs-mittel	Aussaat nach 60 Min.	Aussaat nach 24 Std.
A + P[1]) 1%	Physiologische Kochsalzlösung (0,85% = n/7-NaCl)	0,030	·	·	Destilliertes Wasser	·	·
		0,010	·	·		1	4
		0,003	4	4		4	4
		Aqua dest.	4	4		4	4
0,3%		0,030	·	·		·	·
		0,010	·	·		100	20
		0,003	4	3		4	4
		Aqua dest.	4	4		4	4
0,1%		0,030	·	·		·	·
		0,010	·	·		50	·
		0,003	2	4		4	4
		Aqua dest.	4	4		4	4
0,03%		0,030	·	·		10	·
		0,010	·	·		1	·
		0,003	2	3		4	4
		Aqua dest.	4	4		4	4
0,01%		0,030	·	·		·	·
		0,010	·	·		100 ×	·
		0,003	3	4		4	4
		Aqua dest.	4	4		4	4

Einsaat: 0,1 ccm *Coli*bouillonkultur in 10 ccm der verschiedenen Lösungen des Ansatzes.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 2 000 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

2 000 000 = 4
1 000 000 = 2
500 000 = 1

Ergebnis: Reines Eiweiß hemmt die desinfektorische Steigerung abgestufter geringer n-NaOH-Konzentrationen durch Kochsalz nicht wesentlich. (Auch Vollserum bewirkt in den vorliegenden Konzentrationen bis 1% Eiweiß keine Beeinträchtigung der Desinfektionswirkung.)

Ablauf der Wirkungssteigerung von NaOH und HCl durch die Salze der Ringerlösung in wässeriger und seröser Lösung.

In den Tabellen 9, 9a und 10 sind die wichtigsten Salze des Blutserums, welche in der Ringerlösung für die Herstellung isotonischer Flüssigkeiten sowie zur Besalzung kolloid-isotonischer Lösungen der

[1]) Auf elektro-osmotischem Wege rein dargestelltes *Albumin-Pseudoglobulin*, aus welchem außer den Salzen und dem Euglobulin auch die Eiweißabbauprodukte und fettartigen, organischen Substanzen entfernt sind, auf p_H 7 mit Natronlauge neutralisiert.

Tabelle 9. *Vergleich der Kombinationswirkung der einzelnen Ringerkomponenten in abgestuften Konzentrationen von n-NaOH und n-HCl mit der Wirkung der Ringersalze in den gleichen Alkali- und Säureverdünnungen gegen Colibacillen. (Die Lösungen der Komponenten sind einer physiologischen Kochsalzlösung äquivalent. Die Ringerlösung entspricht der üblichen physiologischen Formel isotonischer Flüssigkeiten.)*

		Aussaat nach				
		1 Std.	4 Std.	24 Std.	7×24 Std.	p_H
NaCl 0,85%	n-NaOH 0,01	6	·	·	·	·
	0,003	> 2	> 2	1000 ×	< 4	·
	0,001	< 3	3	4	> 4	·
	Aqua dest.	> 2	> 3	4	> 4	·
	n-HCl 0,001	3	> 2	> 4	> 4	·
	0,003	< 1	> 1	60	·	·
	0,01	180	·	·	·	·
KCl 1,08%	n-NaOH 0,01	50	·	·	·	·
	0,003	> 2	< 1	< 2	< 3	·
	0,001	> 1	> 1	> 4	> 4	·
	Aqua dest.	3	> 3	> 3	> 4	·
	n-HCl 0,001	> 3	> 3	> 4	> 4	·
	0,003	> 2	< 1	< 3	·	·
	0,01	975	·	·	·	·
$CaCl_2$ 0,82%	n-NaOH 0,01	180	·	·	·	·
	0,003	1105	780	150	< 2	·
	0,001	3	> 1	> 3	< 4	·
	Aqua dest.	< 4	< 4	< 4	> 4	·
	n-HCl 0,001	> 3	< 3	4	> 2	·
	0,003	> 1	> 1	< 2	·	·
	0,01	650	22	·	·	·
Ringer NaCl 1% KCl 0,042% **$CaCl_2$ 0,024%** $NaHCO_3$ 0,03%	n-NaOH 0,01	< 2	·	·	·	> 8,4
	0,003	< 3	< 1	20	·	> 8,4
	0,001	< 3	> 3	> 4	> 4	8,2
	Aqua dest.	< 3	< 3	> 4	> 4	7,4
	n-HCl 0,001	< 2	< 3	< 3	< 4	5,2
	0,003	< 3	< 4	10	< 4	4,3
	0,01	1820	50	·	·	< 2,8
Aqua dest.	n-NaOH 0,01	780	·	·	·	·
	0,003	3	< 2	< 4	> 4	·
	0,001	< 3	> 1	> 4	> 4	·
	Aqua dest.	> 2	> 2	4	> 4	·
	n-HCl 0,001	< 3	< 3	< 1	< 3	·
	0,003	> 2	1090	180	·	·
	0,01	< 1	·	·	·	·

Einsaat: 0,1 ccm Colibouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes in Agargußplatte, entsprechend etwa 30 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben, geschätzt:

30 000 = 4   7 500 = 1

5 000 = 2   < 3 000 = 1000 × sc. Tausende.

Ergebnis: Verstärkung abgestufter Laugekonzentrationen durch NaCl, KCl, $CaCl_2$ und besonders $NaHCO_3$.

Anfängliche Verstärkung abgestufter Säurekonzentrationen durch die Chloride, Hemmung durch Bicarbonat.

Die Ringerlösung zeigt starke Desinfektionswirkung auf der alkalischen Seite gegen *Colibacillen*.

Tabelle 9a.

Vergleich der Kombinationswirkung der einzelnen Ringerkomponenten in abgestuften Konzentrationen von n-NaOH und n-HCl mit der Wirkung der Ringersalze in den gleichen Alkali- und Säureverdünnungen gegen Staphylokokken. (Die Lösungen der Komponenten sind einer physiologischen Kochsalzlösung äquivalent. Die Ringerlösung entspricht der üblichen physiologischen Formel isotonischer Flüssigkeiten.)

		Aussaat nach				
		1 Std.	4 Std.	24 Std.	7×24 Std.	p_H
NaCl 0,85%	n-NaOH 0,01	2	> 2	< 2	.	.
	0,003	> 3	3	< 2	< 1	.
	0,001	> 2	> 3	< 3	< 1	.
	Aqua dest.	> 2	< 2	> 3	2	.
	n-HCl 0,001	2	> 1	2	845	.
	0,003	< 4	520	15	.	.
	0,01	> 1	.	10	.	.
KCl 1,08%	n-NaOH 0,01	2	> 2	> 1	.	.
	0,003	> 2	3	< 3	.	.
	0,001	3	< 3	> 2	> 1	.
	Aqua dest.	> 3	2	> 3	< 1	.
	n-HCl 0,001	> 2	2	4	650	.
	0,003	< 2	180	15	.	.
	0,01	1625	22	70	.	.
$CaCl_2$ 0,82%	n-NaOH 0,01	< 2	1425	> 1	8250	.
	0,003	3	> 1	> 2	> 1	.
	0,001	> 2	3	< 3	< 1	.
	Aqua dest.	2	1105	< 4	< 2	.
	n-HCl 0,001	< 2	2	< 4	8250	.
	0,003	> 1	100	5	.	.
	0,01	< 1	65	6	.	.
Ringer NaCl 1% KCl 0,042% $CaCl_2$ 0,024% $NaHCO_3$ 0,03%	n-NaOH 0,01	> 2	2	< 2	< 1	> 8,4
	0,003	> 2	2	2	< 1	> 8,4
	0,001	> 2	< 3	< 3	180	8,2
	Aqua dest.	> 3	> 2	3	< 3	7,4
	n-HCl 0,001	> 3	> 2	> 3	> 1	5,2
	0,003	> 3	1425	< 1	325	4,3
	0,01	1495	20	10	.	< 2,8
Aqua dest.	n-NaOH 0,01	> 1	< 3	> 4	1425	.
	0,003	> 2	> 2	> 2	.	.
	0,001	4	< 4	< 3	.	.
	Aqua dest.	< 3	> 2	> 4	1425	.
	n-HCl 0,001	< 3	> 2	2	260	.
	0,003	< 2	< 1	> 1	.	.
	0,01	> 1	40	.	.	.

Einsaat: 0,1 ccm *Staphylokokken*bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes in Agargußplatte, entsprechend etwa 30 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen; Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben geschätzt:

30 000 = 4
15 000 = 2
7 500 = 1
< 3 000 = 1000 × sc. Tausende.

Ergebnis: Nur geringe Verstärkung der abgestuften Laugekonzentrationen durch die Chloride ohne Dauerwirkung bei $CaCl_2$; kräftige Verstärkung der Säure. Verstärkung der alkalischen Ansätze durch $NaHCO_3$; Herabsetzung der sauren Ansätze.

Die Ringerlösung weist kräftige Keimverminderung in der schwächsten alkalischen Lösung auf, in welcher die einzelnen Salze, aus welchen sie sich zusammensetzt, geringere Wirkung gegen *Staphylokokken* zeigen.

Tabelle 10. *Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Desinfektionswirkung der Ringerlösung und ihrer Komponenten gegen Colibacillen.*

		Aussaat nach 4 Stunden					Aussaat nach 24 Stunden				
		NaCl 0,85%	KCl 1,08%	$CaCl_2$ 0,82%	Ringer	Aqua dest.	NaCl 0,85%	KCl 1,08%	$CaCl_2$ 0,82%	Ringer	Aqua dest.
In wäss. Lösung	n-NaOH 0,01	·	·	650	·	260	·	·	455	·	520
	0,003	12	5	650	325	585	·	·	8225	1425	3250
	0,001	32	185	455	325	650	10	25	1260	195	6500
	Aqua dest.	715	185	910	260	130	46250	52000	52000	16250	46250
	n-HCl 0,001	3	6	24	130	·	·	·	·	6500	·
	0,003	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	0,01	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
In Eiweißlösung[1]	n-NaOH 0,01	780	1040	4875	845	1885	·	·	195	195	·
	0,003	16250	2470	19500	21125	19500	26000	11375	29250	48750	16250
	0,001	16250	17875	35750	16250	30875	16250	8125	27625	17875	6435
	Aqua dest.	24375	1787	16250	19500	21125	52000	40625	61125	26000	30875
	n-HCl 0,001	21125	19500	21125	22750	21125	22750	22750	24375	30875	37375
	0,003	13000	21125	22750	19500	22750	43875	43875	58500	34125	27625
	0,01	845	1425	6500	6500	780	14625	17875	40625	1170	16250
		Bouillonkontrolle 8525					Bouillonkontrolle 52 000				

(Salzkonzentration der Ringerlösung, s. Tab. 9.)

Einsaat: 0,1 ccm 24stündiger Bouillonkultur *Coli* 10fach verdünnt in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes (also etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat) in Agar.

Ergebnis: Bei NaCl, KCl und $CaCl_2$ tritt wie in Tab. 9 und 9a der die Desinfektionswirkung fördernde bzw. hemmende Charakter ebenso wie bei der NaOH und der HCl im ganzen gleichsinnig mit OH- und H'-Ionenkonzentration hervor, wenigstens in den ungepufferten, wässerigen Lösungen.

Dagegen zeigt die Ringerlösung außer dem gleichsinnigen Anstiege auf der alkalischen Seite der p_H ein Optimum der Keimverminderung zwischen 7,0 und 8,4 p_H auch bei Gegenwart von Eiweiß.

[1]) Elektrolytfreies Rinderserumalbumin-Globulin (s. Tab. 8).

Serum- und Gummikolloide Verwendung finden, in ihrem Einfluß auf die Desinfektionswirkung der NaOH geprüft, und zwar gegen Colibacillen und gegen Staphylokokken. Es wurden gegen abgestufte Lauge- und Säurekonzentrationen einer physiologischen Kochsalzlösung äquivalente Lösungen der Ringer-Salze NaCl, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$ angesetzt, ferner Ringer-Lösung und destilliertes Wasser, um den Desinfektionswert dieser und der Lauge bzw. Säure allein festzustellen.

In den ungepufferten Lösungen der Chloride treten die reinen Kationwirkungen der Salze als Desinfektionswirkung oder -hemmung hervor. Und zwar verstärken NaCl und KCl die NaOH-Wirkung; $CaCl_2$ zeigt nur vorübergehend Verstärkung, auf die Dauer eher Hemmung der Laugewirkung gegen Colibacillen, besonders gegen Staphylokokken; die Wirkung der $NaHCO_3$ zeigt sich in einer Verstärkung der NaOH, einer Hemmung der HCl. Die gepufferte Ringer-Salzlösung zeigt kräftige, anhaltende Desinfektionsverstärkung der NaOH, -hemmung der HCl, während die Chloride letztere wenigstens anfangs verstärken.

Gegen Staphylokokken wirken in den alkalischen Reihen die Chloride im ganzen gleichartig, wenn auch verhältnismäßig schlecht, in den sauren gut. $NaHCO_3$ und Ringer (NaOH 0,001 = 8,1 p_H) zeigen dagegen verhältnismäßig gute Abtötung in der alkalischen Reihe.

Während in den verwendeten Konzentrationsverhältnissen NaCl und KCl eine Verstärkung der keimtötenden Wirkung der NaOH bedingen, d. h. in deren quellender Wirkung fördern, wirkt das viel stärker entquellende $CaCl_2$ eher im desinfektionshemmenden Sinne bei Gegenwart freier OH-Ionen (bes. Tab. 9a und 10).

Dies entspricht dem Antagonismus von Lösungen ein- und zweibasiger Salze, durch welchen die Giftwirkung von Lösungen einbasiger Salze auf Funduluseier (*Loeb*), auf Muskeln (*Hoeber*) und die Quellungswirkung auf Gelatine und Gallerten (*Loeb*, *Lenk*) aufgehoben wird.

Während nun bekanntlich solche „äquilibrierten Lösungen", wie sie in den Ringer-, Locke-, Tyrode-Lösungen Verwendung finden, für den Organismus der Säugetiere und des Menschen eingestellt sind, um den von Blut und Lymphe durchspülten Zellen und Geweben ein im osmotischen Druck und, vermittels der Kolloide dieser Flüssigkeiten, auch im kolloid-osmotischen Druck annähernd isotonisches Medium gegenüberzustellen, genügt die schwache Alkalescenz dieser Lösungen schon, um deutliche desinfektorische Effekte auf Mikroben zu erzeugen. Während dieser Effekt bei den reinen Salzlösungen in den steigenden alkalischen bzw. sauren Reihen gleichmäßig hervortritt, bei $CaCl_2$ in den alkalischen Reihen deutliche Hemmung aufweisend, tritt er in der fast neutralen Reihe besonders scharf zugunsten der Ringer-Lösung hervor, die zwischen 7 und 8, 4 p_H (0,001 n-NaOH) eine kräftige Bactericidie gegen Coli und Staphylokokken aufweist, welche auch bei Gegenwart von Serumeiweiß

zwischen 7,2 und 7,4 p_H noch angedeutet ist. Daß diese Wirkung allein auf eine bestimmte titrimetrische Alkalescenz zu beziehen sei, ist aus den vorstehenden Versuchsergebnissen nicht anzunehmen. Während der fördernde oder hemmende Charakter der Salze gegen Säure und Lauge bei NaCl, KCl und $CaCl_2$, von vorübergehenden anfänglichen Hemmungen abgesehen, mit der H- und OH'-Konzentration gleichsinnig hervortritt, ist in der Ringer-Lösung noch in engeren Grenzen zwischen 7 und 8,4 p_H ein Desinfektionsoptimum gegeben, und zwar gegen Staphylokokken und gegen Coli. Es können also nicht die Alkalimengen den Grad der Desinfektionswirkung allein bedingen, vielmehr müssen in der Ringer-Lösung kleine Verschiebungen der p_H auf der alkalischen Seite, im Sinne eines Synergismus bzw. Antagonismus der Salzwirkung in bezug auf Quellung und Entquellung, optimale Desinfektionswirkungen schaffen, welche den reinen Salzlösungen in dieser Eigenart nicht zukommen.

Zusatz von elektrolytfreiem Eiweiß in Konzentrationen von 1—2%, zu den Salzlauge- bzw. -säure-Systemen hemmt deren Desinfektionswirkung schon wesentlich, wie aus den Tabellen 10 und 11 hervorgeht. Auch in Serum-Ringer-Lösung aber ist eine eng umgrenzte Desinfektionswirkung, etwas über dem Alkalescenzwert der neutralen Reihe (7,2 bis 7,8 p_H) ausgesprochen, wie es bei den wässerigen Lösungen schon näher beschrieben wurde.

Tabelle 11. *Vergleich der Desinfektionswirkung nach p_H abgestufter wässeriger und eiweißhaltiger Ringer-Lösungen.*

	Ringer-Lösung			Rinderserum (A + P) elektrolytfrei nach Ringer besalzen (0,7%)			Rinderserum (A + P) elektrolytfrei nach Ringer besalzen (2,1%)		
	1 Std.	4 Std.	24 Std.	1 Std.	4 Std.	24 Std.	1 Std.	4 Std.	24 Std.
6,8 p_H	1950	650	100	1160	4875	6500	1690	1950	8225
7 p_H	1690	1160	1300	1105	1235	4875	910	1160	9750
7,6 p_H	**1105**	**1235**	**650**	**260**	**780**	**3250**	**455**	**1300**	**6500**
8,4 p_H	1625	1435	**20**	780	3250	8225	1560	2080	**3250**
> 8,4 p_H	1430	650	130	1235	6500	1425	80	1625	6500
Kontrolle ohne Ringer	1875	2795	6500	1690	6500	9750	3510	4875	6500

Einsaat: 0,1 ccm 24stündiger Bouillonkultur von *Coli*, 10fach verdünnt, in je 4 ccm des Ansatzes.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes (also etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat) in Agar. Ringer-Lösung s. Tab. 9.

Ergebnis: Optimum der Keimverminderung in wässeriger und eiweißhaltiger Ringer-Lösung gegen Coli zwischen 7 und 8,4 p_H.

Die Bedeutung der Salze im Serum und auch des Serumeiweißes selbst, welches als Puffer wirkt, liegt also nicht nur in der kolloid-isotonischen Anpassung und ständig regulierten Ausgleichung eines höchst

verwickelten Zellstoffwechselmilieus, sie erscheinen vielmehr auch schon in diesen primitiven Versuchsanordnungen, als ein für körperfremde Zellen im desinfektorischen Sinne widriges Milieu, plausibel genug, um in ihnen einen wichtigen Faktor der natürlichen Baktericidie der Sera zu erblicken, welcher durch die ständige Ausgleichung des Verbrauchs zu Dauerwirkungen besonders geeignet erscheint. Die Baktericidie des frischen Normalserums beruht wahrscheinlich zu einem wesentlichen Teile auf der eigenartigen Verteilung der anorganischen Elektrolyte und des Serumeiweißes bei einer optimalen OH-Ionenkonzentration, was die Annahme *von Behrings* über die Bedeutung der Alkalescenz für die Baktericidie gewisser Sera bestätigt und erweitert.

Die Abnahme der komplementären[1]) und baktericiden Funktion des Serums durch Erhitzung auf 56° oder längeres Stehen erklärt sich z. T. wohl aus der Veränderung der Reaktion (von 7,6—7,2—7,0 p_H), welche mit der Inaktivierung unter gleichzeitiger Abnahme der Viscosität und des osmotischen Druckes vor sich geht, wobei ein Teil der Serumkolloide, besonders des Euglobulins und der Lipoide, unter Beteiligung des Calciums, eine erhebliche Verteilungsveränderung erfährt (Dispersionsvergröberung).

Abgesehen von dem theoretischen Interesse, welches diese Sachverhalte besonders hinsichtlich der Mechanismen der inneren Desinfektion und der Immunität erwecken müssen, worauf später zurückzukommen sein wird, lag es nahe, die im vorhergehenden untersuchten einfachsten Kombinationswirkungen in der ärztlichen Praxis in geeigneten Fällen zur Anwendung zu bringen[2]). War doch neben der desinfektorischen Wirkung, zumal bei oberflächlichen Entzündungs- und Infektionsprozessen, in Wunden, auf Schleimhäuten, in serösen Höhlen usw., eine Auflockerung der oberflächlichen Zellschichten, eine Lösung frischer entzündlicher Exsudate und eine Beeinflussung der zelligen Exsudation des behandelten Gebietes zu erwarten. Tierversuche hatten ergeben, daß $^n/_{70}$—$^n/_{100}$ NaOH- bzw. Na_3PO_4- sowie $^n/_{30}$ HCl-Lösungen in Kombination mit Salzen bis zur Hälfte der Gesamtblutmenge in die Bauchhöhle, bis zu einem Drittel anstandslos in die Venen eingespritzt werden konnten.

Neuere Forschungen haben Mechanismen zum Gegenstande, welche die natürliche Bactericidie des Normalserums aufs engste berühren müssen. Während die Untersuchungen *Keyssers* aus dem Wassermannschen Laboratorium (1911) den Einfluß der Erkältung in serologischer Hinsicht zum Gegenstande hatten und besonders die Abnahme der normalen Antikörper sowie des Komplementes nachweisen konnten, sind von *Kraus und seinen Mitarbeitern* frühere Beobachtungen *Hamburgers* über die leukocytosefördernden Eigenschaften von Ca-Salzen erweitert

[1]) *Ruppel*, *Ornstein*, *Carl* und *Lasch*, Zeitschr. f. Hyg. **97**.

[2]) Über die Anwendung dieser Flüssigkeiten in der chirurgischen Praxis und, wie hier vorweggenommen sei, auch ihrer Kombination mit geringen Konzentrationen von Desinfektionsmitteln wird Prof. *Keysser* berichten.

worden durch die experimentelle Feststellung, daß K-Vermehrung zu einer OH-Ionenabspaltung, Ca-Vermehrung zu einer H-Ionenabspaltung an den Zellen führt und letztere im Sinne positiver, erstere im Sinne negativer Chemotaxis auf die Leukocyten einwirkt (*Zondeck*).

Es wurde weiterhin gefunden, daß diese chemotaktischen Wirkungen auch mit einer Sympathicusreizung, welche zu Ca-Vermehrung im Gewebe, K-Vermehrung im Blut, OH-Abspaltung und Leukopenie in dem betreffenden Bereiche Veranlassung gibt, sowie mit einer Vagusreizung koinzidieren, welche zu K-Vermehrung im Gewebe, Ca-Vermehrung im Blut, H-Abspaltung und Leukocytose Veranlassung gibt. (*Wollheim*, Klin. Wochenschr. **10**. 1925.)

Diese Befunde müssen nicht nur von großer Bedeutung für das Problem der Entzündung und Wundheilung sein, auf welches *Wollheim* allgemein hinweist, sondern auch für die natürlichen Abwehrkräfte in ihrer Beziehung zur Disposition und zum Ablauf der normalen und spezifischen Immunitätsreaktionen und damit für Wirkungsmöglichkeiten im Sinne einer physiologischen Antisepsis und, wie hier vorweggenommen sei, von Desinfektionsmitteln.

Einfluß von Basen, Säuren und Salzen auf Desinfektionsmittel in wässerigen und eiweißhaltigen Lösungen.

Um den Einfluß der Lösungsmittel auf die Wirkung der Desinfektionsmittel zu prüfen, wurden typische Vertreter verschiedener Kategorien den verschiedenen Bedingungen einfachster Art, wie sie bisher den Gegenstand der Untersuchungen bildeten, unterworfen. Die Wirkung der Desinfektion wurde also in wässerigen, besalzenen, schwach alkalischen, schwach sauren und kombinierten Lösungen, gelegentlich auch in Ringer-Lösung und in Serum geprüft.

Von Desinfektionsmitteln wurden, neben den zu den ersten Versuchen herangezogenen Säuren, Basen und Salzen, welche nur als Lösungsmittel verschiedener Art und Einflusses in Betracht kamen, Phenol, $HgCl_2$, $AgNO_3$, $CuSO_4$, Chinin und dessen Derivate, Optochin, Eukupin, Vuzin, endlich die Acridinverbindungen, Trypaflavin, Rivanol und Flavizid verwendet. Ich verfolgte dabei zugleich den Zweck, aus den in vitro und gegebenenfalls im Tierversuch gewonnenen Ergebnissen Anhaltspunkte für die Technik der allgemeinen Desinfektion, der Desinfektion von Wunden, serösen Höhlen und Schleimhauterkrankungen, endlich auch der inneren Desinfektion zu gewinnen.

Phenol.

In der Tabelle 12 sind die Aussaaten nach verschiedener Zeit aus fallenden Phenolverdünnungen verzeichnet, welche mit destilliertem Wasser, in physiologischer Kochsalzlösung, in $^n/_{100}$ NaOH, in physiologischer NaCl-Lösung entsprechend einer $^n/_{100}$ NaOH und in Bouillon hergestellt wurden. Die Übersicht ergibt deutlich geringe Steigerung der Desinfektionswirkung des Phenols durch NaCl, starke Steigerung durch NaOH, welche sich in ihrem kurvenmäßigen Ablauf als eine Desinfektionshemmung der NaOH durch Phenol herausstellt, und die Verstärkung der beiden Komponenten durch physiologische Besalzung.

Tabelle 12. *Einfluß des Kochsalzes ($^n/_7$) und der Natronlauge ($^n/_{100}$) auf die Wirkung abgestufter Konzentrationen von Phenol (Hemmung der NaOH-Wirkung durch Phenol).*

Phenol-konz.	Aqua dest.				NaCl (0,85%)				$^n/_{100}$ NaOH (0,04%)				NaCl (0,85%) + $^n/_{100}$ NaOH				Bouillon			
	0 Min.	60 Min.	24 Std.	7×24 Std.	0 Min.	60 Min.	24 Std.	7×24 Std.	0 Min.	60 Min.	24 Std.	7×24 Std.	0 Min.	60 Min.	24 Std.	7×24 Std.	0 Min.	60 Min.	24 Std.	7×24 Std.
3%	3	50	·	·	1—2	·	·	·	3	100	·	·	2	20	·	·	4	·	·	·
1%	4	4	1	·	4	4	1	·	4	4	·	·	3—4	2	·	·	4	4	1	·
0.3%	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	·	4	2	·	·	4	4	4	4
0,1%	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	·	·	1	100×	·	·	4	4	1	4
0,03%	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100×	30	·	1000×	20	·	·	4	4	4	4
Aqua dest.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100×	·	4	100×	50	·	·	4	4	4	4

Einsaat: 0,1 ccm Colibouillonkultur in je 5 ccm der Ansätze.

Aussaat: 0,1 ccm in Agargußplatte, entsprechend etwa 2 000 000 Keimen in ausgezählten Bouillonkontrollen, Zahl der ausgewachsenen Keime im Versuch vergleichend, unter Stichproben geschätzt:

2 000 000 = 4
1 000 000 = 2
500 000 = 1
< 250 000 = 1000 × sc. Tausende
100 × sc. Hunderte.

Ergebnis: Verstärkung der Phenolwirkung durch NaCl, besonders aber durch $^n/_{100}$ NaOH und durch alkalische NaCl-Lösung. Der kurvenmäßige Ablauf der Verstärkung der abgestuften Phenolkonzentrationen in den mittleren Verdünnungen stellt sich gegen die Kontrollen als *eine Hemmung der Alkali- und Alkalisalzwirkung* heraus.

Die Steigerung der Phenolwirkung durch Kochsalz wird bekanntlich durch die geringe Konzentrationssteigerung der vom Salz zurückgedrängten Carbolsäure erklärt. Die Hemmung der Natronlauge in den mittleren Konzentrationen beruht wohl auf dem Zusammenwirken annähernd äquivalenter bzw. steigender Mengen des lipoidlöslichen Phenols mit einer starken Base, welches letztere verlangsamt zur Wirkung kommen läßt.

$AgNO_3$.

Von den Schwermetallsalzen wurde insbesondere Silbernitrat geprüft und den verschiedensten Bedingungen der Lösung unterworfen. Aus der ersten Tabelle (13) ist ersichtlich, daß die reine Desinfektionswirkung des Silbers sehr stark ist; Silberchlorid, welches sich in Kochsalzlösung bildet, hat praktisch keine Desinfektionswirkung; $^n/_{100}$ Natriumbicarbonatlösung verstärkt die Silbernitratwirkung, noch kräftiger $^n/_{100}$ Natronlauge, welche allein diese Wirkung gegen Staphylokokken nicht entfaltet. Bei Besalzung der Bicarbonat- und Laugelösungen von Silbernitrat wird dessen Wirkung gegen die wässerige Lösung bedeutend

eingeschränkt und sinkt bei der Bicarbonatkochsalzlösung fast auf den Wert des Silberchlorids herab.

Ganz anders stellt sich die Wirkung dieser Reihen im Serum dar. Im Serum gleichen sich die Desinfektionswirkungen verhältnismäßig aus, doch tritt besonders deutlich zutage die Verstärkung der Silberwirkung in den höheren OH-Konzentrationen durch Kochsalz. Hier wirken die Serumkolloide im bekannten Sinne einer günstigen Verteilung des Silberchlorids, welches in dem OH-ionenreichen Milieu durch die physiologische Besalzung beträchtlich verstärkt wird. Beachtenswert erscheint besonders die Dauerwirkung der alkalischen Lösungen nach 48 Stunden

Tabelle 13. *Vergleich der Desinfektionswirkung von $AgNO_3$ in verschiedenen Lösungsmitteln, unter Berücksichtigung insbesondere des Einflusses von Natriumbicarbonat und Natronlauge sowie von Kochsalz, in wässeriger und 50 proz. Serumlösung (etwa 4 proz. inaktivierten Rinderserums).*

$AgNO_3$	Gelöst in		Aussaat nach 4 Std.							Aussaat nach 24 Std.							Aussaat nach 48 Std.						
			1:100	1:800	1:1000	1:8000	1:10 000	1:80 000	1:100 000	1:100	1:800	1:1000	1:8000	1:10 000	1:80 000	1:100 000	1:100	1:800	1:1000	1:8000	1:10 000	1:80 000	1:100 000
Aqua dest.	·	·	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+
	·	n/100 $NaHCO_3$	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+
	·	n/100 NaOH	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	−	−
	NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	desgl.	n/100 $NaHCO_3$	+	+	±	+	+	+	+	−	±	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+
	„	n/100 NaOH	−	±	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+
in 50 proz. Rinderserum[1]	·	·	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	±	+	+	+
	·	n/100 $NaHCO_3$	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	±	−	−	−	+	+	+
	·	n/100 NaOH	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+
	NaCl (0,85%)	·	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
	desgl.	n/100 $NaHCO_3$	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	±	+	+
	„	n/100 NaOH	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−	+	±	+

Einsaat: 0,1 ccm 24stündiger Bouillonkultur von *Staphylokokken* in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes (also etwa 1/2000 der Einsaat) in 2,5 ccm Traubenzuckerbouillon.

Ergebnis: In wässeriger Lösung wird die Desinfektionskraft des Silbernitrats durch Alkalien gesteigert, durch Salz aufgehoben, durch Alkali und Salz herabgesetzt. (Säure wirkt einschränkend und stark verzögernd; s. folgende Tabellen.) Bei Gegenwart von Serum, das die Desinfektionswirkung des Silbernitrats im ganzen einschränkt, wird durch Salzzugabe die Desinfektionswirkung noch weiter herabgesetzt, durch Alkali und durch Alkali und Salz dagegen so gesteigert, daß die Wirkung des Silbernitrats in wässeriger Lösung („reiner Desinfektionswert") fast wieder erreicht wird.

[1]) Bei den Salzzusätzen ist berücksichtigt, daß das Serum eine Hälfte des Salzansatzes enthält.

gegenüber den neutralen, in welchen offenbar eine Gewöhnung der Mikroben eintritt, nachdem die früheren Aussaaten nach 24 Stunden eine Überempfindlichkeit hatten zutage treten lassen. Als solche dürfte die Abtötung der überlebenden Keime bei Überimpfung aus den Ansatzröhrchen nach 24 Stunden aus Bouillon zwanglos zu erklären sein, da die Aussaat nach 48 Stunden (Zimmertemperatur) in den Grenzwerten wieder gutes Wachstum zeigt. Als Serum wurde inaktiviertes Rinderserum in der Verdünnung 1 : 2 verwendet.

Um den Einfluß der geprüften Lösungsmittel reiner in Erscheinung treten zu lassen, wurden in anderen Versuchsreihen statt des Vollserums elektrolytfreies, vom Euglobulin getrenntes Rinderserum[1]) in der gleichen Verdünnung verwendet. In diesen Reihen zeigte sich, wie aus den Tabellen (14—15) hervorgeht, das Verhalten des Silbernitrats ziemlich analog in den wässerigen Lösungen; nur war die Wirkung im ganzen deutlich herabgesetzt. Während nun im allgemeinen die unbesalzenen Lösungen stärkste Wirkung aufweisen, und zwar die alkalischen mit einer Steigerung, die sauren mit starker Einschränkung, besonders bei Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs und bei Eiweißzusatz, zeigen die besalzenen Ansätze eine bedeutende Wirkung nur bei Gegenwart von Alkali.

Daß diese Wirkungen unter den physiologischen Bedingungen der Besalzung und bei Eiweißgegenwart analog sind, geht aus Tabelle 14a hervor. Hier sind fallende Konzentrationen von Silbernitrat in Ringerlösung von reihenweise steigenden p_H in der desinfektorischen Wirkung verglichen, und zwar in wässeriger und in eiweißhaltiger Lösung.

Aus diesen Reihen ist ersichtlich, daß in wässeriger Lösung die absolute Desinfektion mit steigenden p_H eine mit dem Ringeroptimum zusammenfallende mittlere Reihe stärkster Abtötung aufweist. In Gegenwart von elektrolytfreiem Eiweiß (Albumin-Globulin s. Tab. 8 u. 8a) zeigen die Reihen 6,6—7 p_H, welche einer schwachsauren bzw. neutralen Reaktion entsprechen, auch nur verhältnismäßig geringe relative Keimverminderung, welche mit steigendem p_H dann mächtig zunimmt; während die absolute Desinfektionswirkung bei 7,6—8,4 p_H dem reinen Wirkungswert des Silbernitrats nahekommt.

Es ist hier auf die starken Analogien zwischen der Silberwirkung und der der Acridiniumderivate, besonders in Tabelle 24 des Flavizids zu verweisen, wobei besonders auf die im Vergleich mit Sublimat und den höheren Homologen des Chinins verhältnismäßig geringe Hemmung in Eiweißlösung zu achten ist.

[1]) Auf elektroosmotischem Wege rein dargestelltes Albuminpseudoglobulin, aus welchem außer den Salzen und dem Euglobulin auch die Eiweißabbauprodukte und fettartigen, organischen Substanzen entfernt sind. S. auch Tab. 8 u. a. a. O.

Tabelle 14. *Vergleich der Desinfektionswirkung von $AgNO_3$ und $CuSO_4$ in verschiedenen Lösungsmitteln unter Berücksichtigung des Einflusses von NaOH, HCl, NaCl auf den reinen Wirkungswert in wässeriger und eiweißhaltiger Lösung (1,4%).*

Desinfektionsmittel	Lösungsmittel		Aussaat nach 4 Std.								Aussaat nach 24 Std.								Aussaat nach 8 Tagen							
			1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	Kontrolle	1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	Kontrolle	1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	Kontrolle
$AgNO_3$ In wässeriger Lösung	·	·	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
	·	$^n/_{333}$ NaOH	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	·	$^n/_{333}$ HCl	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	±	+	±	–	+	+	+
	desgl.	$^n/_{333}$ NaOH	±	±	±	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
	„	$^n/_{333}$ HCl	±	–	+	±	+	±	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
$AgNO_3$ In Eiweißlösung (1,4%)	·	·	–	–	–	±	–	+	+	+	20	15	–	–	–	24	780	22 750	–	–	–	–	–	–	+	+
	·	$^n/_{333}$ NaOH	–	–	–	±	±	+	+	+	38	11	–	–	–	12	30 875	32 500	–	–	–	–	–	–	+	+
	·	$^n/_{333}$ HCl	–	–	+	+	+	+	+	+	21	10	4	33	32	16	14	21 125	–	+	–	+	+	+	+	+
	NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+	+	+	1170	1215	1425	1170	780	455	975	24 875	+	+	+	+	+	–	+	+
	desgl.	$^n/_{333}$ NaOH	+	+	+	+	+	+	+	+	650	780	–	–	–	–	455	19 500	+	+	–	–	–	–	+	+
	„	$^n/_{333}$ HCl	±	+	+	+	+	+	+	+	1300	–	520	–	455	1040	1040	17 875	+	+	+	+	+	+	+	+
$CuSO_4$ In wässeriger Lösung	·	·	–	–	±	+	+	+	+	·	–	–	–	–	–	–	–	·	–	–	–	–	–	–	–	·
	·	$^n/_{333}$ NaOH	–	–	+	+	+	+	+	·	–	–	–	±	+	+	+	·	–	–	–	–	–	–	–	·
	·	$^n/_{333}$ HCl	–	+	±	+	+	+	+	·	–	–	–	–	–	+	+	·	–	–	–	–	–	–	–	·
	NaCl (0,85%)	·	–	–	–	–	–	+	+	·	–	–	–	–	–	–	–	·	–	–	–	–	–	–	–	·
	desgl.	$^n/_{333}$ NaOH	–	–	–	–	+	+	+	·	–	–	–	–	–	+	+	·	–	–	–	–	–	–	–	·
	„	$^n/_{333}$ HCl	–	–	–	–	–	±	+	·	–	–	–	–	–	–	–	·	–	–	–	–	–	–	–	·
$CuSO_4$ In Eiweißlösung (1,4%)[1]	·	·	–	+	+	+	+	+	+	·	–	–	–	390	4875	16 250	21 125	·	–	–	–	+	+	+	+	·
	·	$^n/_{333}$ NaOH	–	+	+	+	+	+	+	·	–	–	4	70	11 875	11 375	29 250	·	–	–	–	±	+	+	+	·
	·	$^n/_{333}$ HCl	–	–	+	+	+	+	+	·	–	–	–	650	845	19 500	27 625	·	–	–	–	+	+	+	+	·
	(NaCl 0,85%)	·	–	–	–	+	+	+	+	·	–	–	–	370	19 500	24 375	32 500	·	–	–	–	+	+	+	+	·
	desgl.	$^n/_{333}$ NaOH	–	–	–	+	+	+	+	·	–	–	–	260	34 125	34 125	24 875	·	–	–	–	+	+	+	+	·
	„	$^n/_{333}$ HCl	–	–	–	+	+	+	+	·	–	–	–	15	260	650	4875	·	–	–	–	+	+	+	+	·

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* (St. alb.) in destilliertem Wasser entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 2 ccm der Ansätze. — *Aussaat:* Eine Öse, etwa $^1/_{1000}$ der Einsaat in 2,5 ccm Traubenzuckerbouillon. Die Serumreihen nach 24 Stunden in Agargußplatten ausgezählt. — *Ergebnis:* Steigerung des „reinen Wirkungswerts" von $AgNO_3$ durch Alkali; Herabsetzung durch Säure; Aufhebung durch NaCl; geringe Herabsetzung bei Gegenwart von Alkali und Salz, starke durch Säure und Salz. — In Eiweißlösung durch Alkali sowie durch Alkali und Salz die reine Wirkung wässeriger Lösung fast wieder erreicht (s. auch Tab. 15). — $CuSO_4$ durch Alkali in seiner reinen Wirkung eingeschränkt, durch Säure etwas verstärkt, am stärksten durch NaCl und HCl/NaCl. — Analoges Verhalten, wenn auch stark verwischt, bei Gegenwart des sehr stark hemmenden Eiweißes.

[1]) Elektrolytfreies Rinderserum Albumin-Globulin (s. Tab. 8).

Tabelle 14a. *Einfluß verschiedener p_H auf die Desinfektionswirkung abgestufter Konzentrationen von $AgNO_3$ in Ringer-Lösung (s. Tab. 9) und in elektrolytfreiem Eiweiß (Albumin-Pseudoglobulin, s. Tab. 8 u. a.), nach Ringer besalzen.*

	p_H	Aussaat nach 4 Stunden							Aussaat nach 24 Stunden						
		1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000
In wässeriger Lösung	6,6	455	650	650	1170	910	910	3250	·	·	12	60	25	325	390
	7	130	520	130	910	195	650	1170	·	·	·	15	20	62	130
	7,8	130	520	·	130	195	390	455	·	·	·	·	·	·	·
	8,4	130	70	585	715	100	455	650	·	·	·	·	20	24	30
	Aqua dest.	455	715	1170	1170	1170	1105	1235	·	·	24	12	17	7	36
In Eiweißlösung (1,4%)	6,6	910	910	1670	3250	3250	3250	6500	910	980	910	2145	1625	390	520
	7	715	650	1195	1425	3250	3250	4875	260	715	780	910	1235	520	780
	7,8	650	1670	650	1170	585	585	1425	·	50	·	70	·	520	3250
	8,4	455	130	520	585	650	1300	3250	·	·	·	·	·	780	1170
	Aqua dest.	715	390	130	390	455	1425	4875	·	·	·	·	·	780	2145
		Bouillonkontrolle 6500							Bouillonkontrolle 32 500						

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* in destilliertem Wasser, entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes, etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat, in Agargußplatte.

Ergebnis: Abhängigkeit der Silbernitratwirkung in Ringer-Lösung von einer optimalen OH′-Konzentration, welche mit dem Ringer-Optimum zusammenfällt (Katalytische Wirkung des Silbers?).

Auch bei Gegenwart von reinem Eiweiß in Ringer-Lösung, welches die Wirkung des Silbers nur wenig einschränkt, besteht diese Abhängigkeit von einer bestimmten OH-Ionenkonzentration.

Aufhebung der Wirkung des Silbers bei neutraler bzw. schwach saurer Reaktion. (Analogie zur Wirkung der Acridinderivate; s. Tab. 24. Flavizid.)

Bei der Anwendung von Silberlösungen im Organismus, auf Schleimhäuten oder in der Blutbahn, sind die Bedingungen einer Chloridbildung und der kolloidalen Verteilung meistens gegeben. Seine Wirkung ist aber in hohem Maße von einer gewissen Alkalescenz abhängig, welche gerade örtlich sehr häufig fehlt bzw. nach der saueren p_H-Seite abgeändert sein kann. Es dürfte sich deshalb ein Überschuß von Alkali, und zwar in Form von Natronlauge in den verwendeten Lösungen empfehlen. Ein Zusatz von Salz würde dabei abhängig zu machen sein vom Orte der Anwendung und jedenfalls eine Dauerwirkung nicht beeinträchtigen.

Am auffälligsten ist, besonders in den Tabellen mit elektrolytfreiem Serum, der zonenmäßige Ablauf der Desinfektion, welcher besonders in der alkalischen Reihe scharf ausgeprägt erscheint, und nur in den Verdünnungen zwischen 1 : 1000—30 000 eine vollständige Desinfektion bewirkt, und mit der breiten Hemmungszone im Beginne der Reihe an das Neisser-Wechsbergsche Phänomen in bakteriolytischen Reagensglasversuchen u. a. m. erinnert.

Tabelle 15. *Vergleich der Desinfektionswirkung von $HgCl_2$ und $AgNO_3$ in verschiedenen Lösungsmitteln unter Berücksichtigung des Einflusses von NaOH, HCl, NaCl auf den reinen Wirkungswert in wässeriger und eiweißhaltiger Lösung (1,4%).*

Aussaat nach 4 Std.

	Desinfektionsmittel	Lösungsmittel		1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	1:300 000	Kontrolle
In wässeriger Lösung	$AgNO_3$	·	·	–	–	–	–	–	–			+
		·	n/333 NaOH	–	–	–	–	–	+			+
		·	n/333 HCl	–	–	–	±	±	+			+
		NaAl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+			+
		desgl.	n/333 NaOH	–	±	±	±	+	+			+
		„	n/333 HCl	–	+	+	+	+	+			+
In Eiweißlösung [1,4%][1])	$AgNO_3$	·	·	–	–	–	±	+	+			+
		·	n/333 NaOH	–	–	–	+	+	+			+
		·	n/333 HCl	–	–	+	+	+	+			+
		NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+			+
		desgl.	n/333 NaOH	±	+	+	+	+	+			+
		„	n/333 HCl	+	+	+	+	+	+			+
In wässeriger Lösung	$HgCl_2$	·	·			–	–	–	–	±	+	
		·	n/333 NaOH			–	–	–	±	±	+	
		·	n/333 HCl			–	–	–	–	–	–	
		NaCl (0,85%)	·			–	–	–	–	–	+	
		desgl.	n/333 NaOH			–	–	–	–	–	+	
		„	n/333 HCl			–	–	–	–	–	±	
In Eiweißlösung [1,4%][1])	$HgCl_2$	·	·			–	–	–	+	+	+	
		·	n/333 NaOH			–	±	+	+	+	+	
		·	n/333 HCl			–	–	–	+	+	+	
		NaCl (0,85%)	·			–	–	–	+	+	+	
		desgl.	n/333 NaOH			–	–	±	+	+	+	
		„	n/333 HCl			–	–	–	+	+	+	

Aussaat nach 24 Std.

	Desinfektionsmittel	Lösungsmittel		1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	1:300 000	Kontrolle
In wässeriger Lösung	$AgNO_3$	·	·	–	–	–	–	–	–			+
		·	n/333 NaOH	–	–	–	–	–	–			+
		·	n/333 HCl	–	+	–	–	–	–			+
		NaAl (0,85%)	·	±	+	+	+	+	+			+
		desgl.	n/333 NaOH	–	–	–	–	–	–			+
		„	n/333 HCl	–	+	–	+	+	+			+
In Eiweißlösung [1,4%][1])	$AgNO_3$	·	·	–	+	–	–	–	+			+
		·	n/333 NaOH	–	–	–	–	–	+			+
		·	n/333 HCl	–	–	–	+	+	+			+
		NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+			+
		desgl.	n/333 NaOH	+	+	+	–	–	+			+
		„	n/333 HCl	+	+	+	+	+	+			+
In wässeriger Lösung	$HgCl_2$	·	·			–	–	–	–	–	–	
		·	n/333 NaOH			–	–	–	–	–	–	
		·	n/333 HCl			–	–	–	–	–	–	
		NaCl (0,85%)	·			–	–	–	–	–	+	
		desgl.	n/333 NaOH			–	–	–	–	–	+	
		„	n/333 HCl			–	–	–	–	+	–	
In Eiweißlösung [1,4%][1])	$HgCl_2$	·	·			–	–	–	+	+	+	
		·	n/333 NaOH			–	–	–	+	+	+	
		·	n/333 HCl			–	–	–	+	+	+	
		NaCl (0,85%)	·			–	–	+	+	+	+	
		desgl.	n/333 NaOH			–	+	–	+	+	+	
		„	n/333 HCl			–	–	–	+	+	+	

Aussaat nach 3 Tagen

	Desinfektionsmittel	Lösungsmittel		1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	1:300 000	Kontrolle
In wässeriger Lösung	$AgNO_3$	·	·	–	–	–	–	–	–			+
		·	n/333 NaOH	–	–	–	–	–	–			+
		·	n/333 HCl	–	–	–	–	–	–			–
		NaAl (0,85%)	·	–	–	–	±	–	–			+
		desgl.	n/333 NaOH	–	–	–	–	–	–			+
		„	n/333 HCl	–	–	–	–	–	±			–
In Eiweißlösung [1,4%][1])	$AgNO_3$	·	·	–	–	–	–	–	–			+
		·	n/333 NaOH	–	–	+	–	–	+			+
		·	n/333 HCl	–	–	–	+	–	+			+
		NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+			+
		desgl.	n/333 NaOH	+	+	–	–	–	–			+
		„	n/333 HCl	+	+	+	+	+	+			+
In wässeriger Lösung	$HgCl_2$	·	·			–	–	–	–	–	–	
		·	n/333 NaOH			–	–	–	–	–	–	
		·	n/333 HCl			–	–	–	–	–	–	
		NaCl (0,85%)	·			–	–	–	–	–	–	
		desgl.	n/333 NaOH			–	–	–	–	–	–	
		„	n/333 HCl			–	–	–	–	–	–	
In Eiweißlösung [1,4%][1])	$HgCl_2$	·	·			–	–	–	+	+	+	
		·	n/333 NaOH			–	–	±	+	+	+	
		·	n/333 HCl			–	–	–	–	+	+	
		NaCl (0,85%)	·			–	–	+	+	+	+	
		desgl.	n/333 NaOH			–	–	–	+	+	+	
		„	n/333 HCl			–	–	–	–	+	+	

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* (St. alb.) in destilliertem Wasser entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 2 ccm der Ansätze. — *Aussaat:* Eine Öse, etwa $^1/_{1000}$ der Einsaat, in 2,5 ccm Traubenzuckerbouillon. — *Ergebnis:* $AgNO_3$ wie Tab. 13. — Herabsetzung des reinen Wirkungswertes von *Sublimat* durch Alkali, Steigerung durch Säure, geringe Einschränkung durch NaCl, starke Herabsetzung durch Eiweiß.

[1]) Elektrolytfreies Albumin-Pseudoglobulin (s. Tab. 8).

Sublimat und Kupfersulfat.

Sublimat wird durch Kochsalz in seiner Wirkung nicht wesentlich herabgesetzt, weiter eingeschränkt durch NaOH, durch HCl dagegen gefördert. Dieses Verhalten gleicht sich in kolloidhaltigen Medien wieder aus und läßt, zumal in der Dauerwirkung, keinen wesentlichen Unterschied zwischen einfach besalzenen und sauren oder alkalischen Lösungen erkennen, wenn der Ansatz bei einem Serumgehalt von 1 : 2 erfolgt. In dem elektrolytfreiem Serum (Tab. 15) dagegen tritt die Einschränkung der Sublimatwirkung durch Kochsalz sowie durch Kochsalz und Lauge deutlich hervor, bei gleichmäßiger, starker Eiweißhemmung.

Kupfersulfat (Tab. 14) wird in wässeriger Lösung durch Kochsalz kräftig verstärkt, durch Natronlauge erheblich eingeschränkt, durch Salzsäure weniger, durch NaCl/HCl mächtig gefördert. Im elektrolytfreien Serum gleichen sich diese Unterschiede durch Eiweißhemmung stark aus, ohne den befördernden Einfluß von Salz und Säure ganz zu verwischen.

Während Silbernitrat im Serum unter den geeigneten Bedingungen seiner Lösung durchaus wirksam erscheint, sind dem Sublimat bekanntlich schon wegen seines Verhaltens zum Eiweiß viel engere Grenzen gesteckt. Dazu kommt noch seine Abhängigkeit von einem optimal sauren Milieu, welches unter den Bedingungen des Organismus nicht gegeben ist. Kupfersulfat wird, an sich viel weniger wirksam und wenn auch durch Kochsalz gefördert, in seiner Wirkung durch Eiweiß in gleicher Weise wie Sublimat, außerordentlich eingeschränkt.

Chininderivate.

Außerordentlich kompliziert in der Abhängigkeit von Lösungsmitteln erscheinen Chinin und seine Derivate. Im ganzen wirken Chinin und dessen Derivate, welche durch Substitution der Methylgruppe am Chinolinkern des Hydrochinins durch aliphatische Gruppen der steigenden Alkoholreihe entstehen, in reinem Wasser am stärksten keimtötend (Tab. 16). NaCl schränkt die Wirkung des Chinins, Optochins und Eucupins stark ein, unbedeutend des Vuzins. (Steigende Reihe!) NaOH ($^n/_{100}$ — $^n/_{300}$) hemmt alle vier Alkaloide, besonders stark die beiden höheren Homologen; HCl ($^n/_{100}$ — $^n/_{300}$) dagegen insbesondere Optochin, weniger Chinin, Eucupin und Vuzin. NaCl und NaOH hemmen die Wirkung aller vier Mittel; NaCl und HCl beeinträchtigen sie, zum mindesten nach 24 Stunden, außer der des Chinins, nicht wesentlich.

Am charakteristischsten tritt die gleichmäßig zunehmende Wirkung des Chinins und seiner Derivate in den neutralen Kochsalzreihen hervor, in welchen die durch *Morgenroth* und seine Mitarbeiter ermittelten Wirkungswerte entsprechend der Alkoholreihe ansteigen.

Tabelle 16. *Vergleich der Desinfektionswirkung von Chinin, Optochin, Eucupin und Vuzin in verschiedenen Lösungsmitteln unter Berücksichtigung des Einflusses von NaOH, HCl, NaCl auf den reinen Wirkungswert in wässeriger Lösung.*

Lösungsmittel		Desinfektionsmittel	Aussaat nach 4 Stunden								Aussaat nach 24 Stunden							
			1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	1:300 000	1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10 000	1:30 000	1:100 000	1:300 000
·	·	Chinin	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
		Optochin	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+
		Eucupin	−	−	±	−	±	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+
		Vuzin	−	−	−	−	−	−	±	+	−	−	−	−	±	+	+	+
·	n/333 NaOH	Chinin	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
		Optochin	−	−	±	+	+	+	+	+	−	−	±	+	+	+	+	+
		Eucupin	−	−	−	±	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+
		Vuzin	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+
·	n/333 HCl	Chinin	±	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
		Optochin	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
		Eucupin	−	−	±	+	+	+	+	+	−	−	−	−	±	+	+	+
		Vuzin	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+
NaCl (0,85%)	·	Chinin	±	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
		Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
		Eucupin	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+
		Vuzin	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	+	+
NaCl (0,85%)	n/333 NaOH	Chinin	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
		Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
		Eucupin	−	−	−	±	+	+	+	+	−	−	±	±	+	+	+	+
		Vuzin	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
NaCl (0,85%)	n/333 HCl	Chinin	−	+	+	+	+	+	+	+	−	±	+	+	+	+	+	+
		Optochin	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+
		Eucupin	−	−	−	−	±	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+
		Vuzin	−	−	−	−	±	±	±	+	−	−	−	−	−	−	+	+

Einsaat: 0,1 ccm 24stündiger *Staphylokokken*bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse, etwa $^{1}/_{2000}$ der Einsaat, in 2,5 ccm Traubenzuckerbouillon.

Ergebnis: Stärkste Wirkung in reinem Wasser, Herabsetzung durch NaCl; Hemmung durch Alkali, besonders bei den höheren Homologen; desgleichen durch Säure, besonders bei Optochin. Alkali und Salz beeinträchtigten stark; weniger Säure und Salz, in der Dauerwirkung jedenfalls nicht wesentlich.

Serumeiweiß setzt die Wirkung der Chininderivate, vor allem der höheren Homologen, zumal bei Besalzung, ohne Rücksicht auf H- oder OH-Ionenkonzentration stark herab (Tab. 17).

Diese Befunde stehen nicht ganz im Einklang mit der Mitteilung von *Michaelis*[1]), nach welcher bei Berücksichtigung konstanter optimaler

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 2, Ref. 13. 1922.

p_H-Zahlen zwischen 7 und 8 p_H die Wirkungswerte der untersuchten Chininderivate in der bekannten Reihenfolge hervortreten. Für neutrale Kochsalzlösung trifft dies offensichtlich zu, wenn auch mit einer Verminderung der Wirkung gegen Lösungen der Alkaloide in reinem Wasser, und zwar insbesondere beim Optochin, welches, wenigstens gegen Staphylokokken, unter letzterer Bedingung den Wert der höheren Homologe nach 24 Stunden fast erreicht. Nach *Michaelis* liegen nun die Optima der Wirkung durchweg um 8 p_H, welchem ungefähr die Alkalescenz wässeriger Lösung in $< {}^n/_{1000}$ NaOH entspricht. Wie aus den hier mitgeteilten Befunden hervorgeht, kann es aber auf die aktuelle Alkalescenz bei der Wirkungssteigerung allein nicht ankommen. Vielleicht spielen die von *Michaelis* als Puffer verwendeten Salze, vermutlich $NaHCO_3$ und Na_2HPO_4 u. a., eine Rolle. Der Zusatz von Alkalihydrat und Kochsalz setzt die Wirkung, zumal bei den höheren Homologen, außerordentlich herab, während entsprechende Säurewerte, welche um ${}^n/_{333}$ HCl allein noch keine beträchtliche Wirkung entfalten, auch bei NaCl-Gegenwart die Derivate in ihrer Wirkung nicht wesentlich beeinträchtigen.

Hailer (l. c.) weist auf die höhere Giftigkeit der Alkaloidbasen (*Overton*) gegen niedere Organismen bei Zusatz von Carbonat und Bicarbonat zu den Lösungen der Alkaloidsalze hin, welche deren Lipoidlöslichkeit erhöhen. *Hailer* dehnt diese Analogien auch auf die Farbstoffe aus, welche meist basischer Natur sind: „Die Ursache der gleichen und höheren Wirksamkeit mancher solcher Farbstoffbasen in Serumgegenwart beruht vermutlich darauf, daß die Puffersalze des Blutes, und auch das Serumeiweiß vermag als solches zu wirken, Säure binden und die stärker wirksame Farbstoffbase frei machen."

Entsprechend den Desinfektionsversuchen mit Ringerlösung wurden auch fallende Konzentrationen der Alkaloide in auf bestimmte p_H eingestellten und abgestuften Ringerreihen vergleichend auf ihre Wirkung untersucht.

Es stellt sich dabei die absolute Desinfektionswirkung des Chinins (Tab. 18) in den wässerigen Lösungen auf ein Optimum zwischen 7 und 7,8 p_H, welches etwa mit dem Optimum der Ringerlösung (a. a. O.) zusammenfällt und wohl zum Teil als Additionswirkung gedeutet werden kann; die relative Keimabnahme dagegen scheint mehr nach der sauren Seite ausgesprochen zu sein und muß wohl auf eine starke, wenn auch verlangsamte Chininwirkung bezogen werden, da in diesen Grenzen Ringerlösung keine wesentliche Desinfektionswirkung entfaltet.

Die reine Chininwirkung in destilliertem Wasser entspricht einem guten Mittelwert der besalzenen Reihen.

Elektrolytfreies Serumeiweiß (Rinderserum A + P) gleicht die Wirkungsdifferenzen verschiedener p_H in der wässerigen Ringerlösung aus und paßt den Effekt des Chinins der steigenden p_H-Reihe in engen

Tabelle 17. *Vergleich der Desinfektionswirkung von Chinin, Optochin, Eucupin, Vuzin in verschiedenen Lösungsmitteln unter Berücksichtigung des Einflusses von NaOH, HCl, NaCl auf den reinen Wirkungswert in wässeriger Lösung und in Eiweißlösung (1,4).*

	pH	Lösungsmittel		Des-infektions-mittel	Aussaat nach 4 Stunden									Aussaat nach 24 Stunden								
					1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10000	1:30000	1:100000	1:300000	Kontrolle	1:000	1:300	1:1000	1:3000	1:10000	1:30000	1:100000	1:300000	Kontrolle
In wässeriger Lösung	.	.	.	Chinin	−	±	±	+	+	+	+	+	+	−	±	−	±	+	+	+	+	+
				Optochin	−	−	±	±	+	+	+	+		−	−	−	−	−	+	+	+	
				Eucupin	−	−	−	±	+	+	+	+		−	−	−	+	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	−	−	−	−	+		−	−	+	±	−	−	−	+	
	.	.	n/333 NaOH	Chinin	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
				Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+		−	−	−	±	+	+	+	+	
				Eucupin	−	−	−	+	+	+	+	+		−	−	−	+	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	+	+	+	+	+		−	−	−	−	+	+	+	+	
	.	.	n/333 HCl	Chinin	−	±	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
				Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+		−	−	+	+	+	+	+	+	
				Eucupin	−	−	−	+	+	+	+	+		−	−	−	−	−	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	−	−	−	−	+		−	−	−	−	−	−	−	+	
	.	NaCl (0,85%)	.	Chinin	−	±	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+
				Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+		−	−	+	+	+	+	+	+	
				Eucupin	−	−	−	±	+	+	+	+		−	−	−	±	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	−	−	±	±	+		−	−	−	−	−	−	+	+	
	.	NaCl (0,85%)	n/333 NaOH	Chinin	−	±	+	+	+	+	+	+	+	−	±	+	+	+	+			−
				Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+		−	−	+	+	+	+			
				Eucupin	−	−	−	−	+	+	+	+		−	−	−	+	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	−	−	+	+	+		−	−	−	−	+	+	+	+	
	.	NaCl (0,85%)	n/333 HCl	Chinin	±	+	+	+	+	+	+	+	+	−	±	−	−	+	+	+	+	+
				Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+		−	+	−	−	−	+	+	+	
				Eucupin	−	−	±	+	+	+	+	+		−	−	−	−	±	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	−	−	−	−	+		−	−	−	−	−	−	±	+	
In Eiweißlösung[1]	7,1	.	.	Chinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+			+
				Optochin	±	+	+	+	+	+	+	+		−	−	−	+	+	+			
				Eucupin	−	−	±	±	+	+	+	+		−	−	±	±	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	±	+	+	+	+		−	−	−	±	±	+	+	+	
	7,6	.	n/333 NaOH	Chinin	+	±	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
				Optochin	−	−	+	+	+	+	+	+		−	−	−	+	+	+	+	+	
				Eucupin	−	−	±	+	+	+	+	+		−	−	±	+	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	±	+	+	+	+		−	−	±	±	+	+	+	+	
	5,8	.	n/333 HCl	Chinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
				Optochin	−	±	+	+	+	+	+	+		−	+	+	+	+	+	+	+	
				Eucupin	−	−	±	±	+	+	+	+		−	−	±	±	+	+	+	+	
				Vuzin	−	−	−	−	+	+	+	+		−	−	±	±	+	+	+	+	

[1]) Elektrolytfreies Rinderserumalbumin-Pseudoglobulin (s. Tab. 8).

Tabelle 17 (Fortsetzung).

	p_H	Lösungsmittel		Desinfektionsmittel	Aussaat nach 4 Stunden									Aussaat nach 24 Stunden								
					1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10000	1:30000	1:100000	1:300000	Kontrolle	1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10000	1:30000	1:100000	1:300000	Kontrolle
In Eiweißlösung[1]	7,2	NaCl (0,85%)	·	Chinin	±	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
				Optochin	–	–	+	+	+	+	+	+		–	+	+	+	+	+	+	+	
				Eukupin	–	–	–	+	+	+	+	+		–	–	–	+	+	+	+	+	
			·	Vuzin	–	–	–	–	+	+	+	+		–	–	±	+	+	+	+	+	
	7,7	"	n/333 NaOH	Chinin	±	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+
				Optochin	+	–	+	+	+	+	+	+		–	–	+	+	+	+	+	+	
				Eukupin	–	–	–	+	+	+	+	+		–	–	+	+	+	+	+	+	
				Vuzin	–	–	–	+	+	+	+	+		–	–	±	+	+	+	+	+	
	6	"	n/333 HCl	Chinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
				Optochin	–	+	+	+	+	+	+	+		–	+	+	+	+	+	+	+	
				Eukupin	–	–	–	+	+	+	+	+		–	–	–	+	+	+	+	+	
				Vuzin	–	–	–	±	+	+	+	+		–	–	±	±	+	+	+	+	

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* in destilliertem Wasser, entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 2 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse, etwa $^1/_{1000}$ der Einsaat, in je 2,5 ccm Traubenzuckerbouillon.

Ergebnis: Wie Tab. 16. Serumeiweiß hemmt die Wirkung stark.

Grenzen an, setzt ihn aber im ganzen herab. Bemerkenswert ist der hemmende Einfluß der Salze bei Gegenwart von Eiweiß; in unbesalzener, neutraler Eiweißlösung wirkt Chinin noch am stärksten.

Optochin (Tab. 19) zeigt ein sehr kompliziertes Bild. Nach kräftiger, gleichmäßiger Anfangswirkung der wässerigen Reihen, unter welchen nur 6,6 p_H in der relativen Keimverminderung etwas zurückbleibt, ist die absolute Desinfektionswirkung nach 24 Stunden eine recht ungleichmäßige. 6,6 und 7,8 p_H zeigen eine vollständige Abtötung bei 1 : 3000; 7,0 p_H bei 1 : 300, 8,4 p_H bei 1 : 1000. Wieder fällt in den vorliegenden Grenzen die stärkste Wirkung mit dem Ringeroptimum zusammen und liegt wahrscheinlich noch etwas über 7,8 p_H (Additionswirkung der Ringerlösung, Katalysatorwirkung des Optochins?). Die absolute Desinfektion und die relative Keimverminderung sind aber auch jenseits 7,0 p_H, welches nach 24 Stunden schlecht wirkt, bei 6,6 p_H wieder stark ausgesprochen und müssen auch bei Optochin, wie beim Chinin, auf das salzsaure Salz bezogen werden.

Auch Optochin zeigt in destilliertem Wasser einen guten Mittelwert der Wirkung der besalzenen Reihen.

Auch bei Optochin, wie bei Chinin, gleicht elektrolytfreies Eiweiß die Wirkungsdifferenzen bei verschiedenen p_H in den wässerigen Ringerreihen

[1]) Elektrolytfreies Rinderserumalbumin-Pseudoglobulin (s. Tab. 8).

Tabelle 18. *Einfluß verschiedener p_H auf die Desinfektionswirkung abgestufter Konzentrationen von Chinin in Ringerlösung und in elektrolytfreiem Eiweiß (Albumin-Pseudoglobulin) nach Ringer besalzen.*

	p_H	Aussaat nach 4 Stunden							Aussaat nach 24 Stunden						
		1 : 100	1 : 800	1 : 1000	1 : 8000	1 : 10 000	1 : 80 000	1 : 100 000	1 : 100	1 : 800	1 : 1000	1 : 8000	1 : 10 000	1 : 80 000	[illegible]
In wässeriger Lösung	6,6	·	·	325	2465	455	1430	2145	·	·	130	80	50	455	[illegible]
	7	·	·	·	1430	2275	1820	1690	·	·	·	90	1560	1625	[illegible]
	7,8	·	·	·	2535	1040	1690	2275	·	·	·	16 250	715	975	[illegible]
	8,1	·	·	325	1820	1105	2665	1105	·	·	75	100	1300	1625	[illegible]
	Aqua dest.	·	·	·	1755	1495	1495	1885	·	·	10	260	1365	1820	[illegible]
In Eiweißlösung [1,4%)[1]	6,6	260	1560	27 625	27 625	29 250	32 500	29 250	·	8225	26 500	30 875	29 250	32 500	[illegible]
	7	585	16 250	29 250	32 500	34 125	11 375	27 625	·	6500	16 250	17 875	26 000	30 875	[illegible]
	7,8	·	650	19 500	26 000	32 500	32 500	34 125	·	195	1625	13 000	17 875	24 375	[illegible]
	8,1	·	1755	4875	29 250	34 125	34 125	32 500	·	35	3250	9750	19 500	32 500	[illegible]
	Aqua dest.	130	325	780	30 875	29 250	32 500	30 875	·	·	130	11 375	24 375	34 125	[illegible]
		Bouillonkontrolle 32 500							Bouillonkontrolle 42 250						

Salzkonzentration der Ringerlösung s. Tab. 9.

Einsaat: **Aufschwemmung von *Staphylokokken* (alb.) in destilliertem Wasser, entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.**

Aussaat: **Eine Öse des Ansatzes, etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat, in Agargußplatte.**

Ergebnis: **Chinin zeigt in Ringerlösung ein Optimum absoluter Desinfektion, welches mit dem Optimum der Ringerlösung zusammenfällt. Die relative Keimabnahme ist nach der sauren Seite hin ausgesprochen.**

Eiweiß setzt die Chininwirkung (bei Salzgegenwart) herab, eine mit der OH-Ionenkonzentration steigende Wirkung ist hier aber angedeutet.

aus und paßt den Effekt des Optochins der steigenden p_H-Reihe in engen Grenzen an, setzt aber diesen auch im Ganzen sehr stark herab. Vielleicht macht sich hier das Fehlen der sonstigen Serumkolloide (besonders der Eiweißabbauprodukte und vielleicht der Lipoide) geltend und fordert zu entsprechenden Versuchsanordnungen auf. Wird doch nach *Schiemann* und *Ishiwara* die entwicklungshemmende Kraft des Salvarsans durch Lecithin verstärkt; ebenso des Sublimats.

Bemerkenswert ist in der Eiweißreihe wieder die starke Wirkung der unbesalzenen neutralen Lösung, welche die Hemmung des Optochins durch Salze bei Eiweißgegenwart scharf hervortreten läßt.

Beim Vuzin (Tab. 20) nehmen in wässeriger Lösung die absolute Desinfektionswirkung und im Ganzen auch die relative Keimabnahme nach der sauren Seite zu, nach der alkalischen ab unter deutlichem Hervortreten von interferenten Hemmungen bei 6,6, 7,8, 8,4 p_H; die Ringer-

[1]) s. Tab. 8.

Tabelle 19. *Einfluß verschiedener p_H auf die Desinfektionswirkung abgestufter Konzentrationen von Optochin in Ringerlösung und in elektrolytfreiem Eiweiß (Albumin-Pseudoglobulin) nach Ringer besalzen.*

	p_H	Aussaat nach 4 Stunden							Aussaat nach 24 Stunden						
		1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10000	1:30000	1:100000	1:100	1:300	1:1000	1:3000	1:10000	1:30000	1:100000
In wässeriger Lösung	6,6	•	•	•	715	1425	3250	4875	•	•	•	•	650	1105	3250
	7	•	•	•	195	100	3250	6500	•	•	195	520	3250	6500	4875
	7,8	•	•	•	130	650	6500	6500	•	•	•	•	1430	1430	3250
	8,4	•	•	65	65	520	4875	3250	•	•	•	390	520	1170	6500
	Aqua dest.	•	•	•	70	1625	3250	4835	•	•	•	•	780	4875	4875
In Eiweiß-lösg. [1,4%][1]	6,6	•	650	1430	1430	4875	14 685	1235	•	130	6500	32 500	19 500	21 125	29 250
	7	•	390	1430	1170	3250	3250	4875	•	780	4875	19 500	26 000	27 625	30 875
	7,8	•	650	780	3250	4875	4875	6500	•	715	1300	11 375	13 000	19 500	26 000
	8,4	•	50	520	4875	1170	3250	3250	•	•	390	1170	13 000	11 375	16 250
	Aqua dest.	•	•	•	1430	3250	1425	4875	•	40	•	3250	9750	13 000	16 250
		Bouillonkontrolle 16 250							Bouillonkontrolle 21 125						

Ringerlösung s. Tab. 9.

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* (alb.) in destilliertem Wasser, entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes, etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat, in Agargußplatte.

Ergebnis: Optochin zeigt in Ringerlösung ein dieser entsprechendes Optimum (7,8 p_H) und jenseits 7 p_H wieder kräftige Verstärkung über den reinen Wirkungswert.

Eiweiß setzt die Wirkung, zumal bei Salzgegenwart, stark herab und paßt den Effekt deutlich der steigenden p_H-Reihe an.

salze wirken deutlich desinfektionshemmend; die reine wässerige Vuzinlösung dagegen beinahe am stärksten. Von einem optimalen Einfluß der p_H 7 bis 8 kann kaum die Rede sein.

Auch die Wirkung des Vuzins wird durch Serumeiweiß außerordentlich herabgesetzt. Hier treten nach 4 Stunden in engsten Grenzen der steigenden p_H-Reihe angepaßte Wirkungen in Erscheinung, bei etwa 3—30-facher Herabsetzung der Wirkung wässeriger Lösungen.

Nach 24 Stunden sind die absolute Desinfektion und die relative Keimabnahme nach der sauren Seite orientiert, ohne mehr als minimale Zunahme der Wirkung, welche jetzt bis zum Mehrhundertfachen hinter der der wässerigen Lösung zurückbleibt. Auch hier wirkt die elektrolytfreie Eiweißlösung noch am besten.

Überblickt man die Chinaalkaloide nach diesen Versuchen nochmals, wobei die verhältnismäßig geringe Wirkung besonders des Chinins und Optochins gegen Staphylokokken zu berücksichtigen ist, so entsprechen

[1]) s. Tab. 8.

Tabelle 20. *Einfluß verschiedener p_H auf die Desinfektionswirkung abgestufter Konzentrationen von Vuzin in Ringerlösung und in elektrolytfreiem Eiweiß (Albumin-Pseudoglobulin) nach Ringer besalzen.*

	p_H	Aussaat nach 4 Stunden							Aussaat nach 24 Stunden						
		1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 30 000	1 : 100 000	1 : 300 000	1 : 1 000 000	1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 30 000	1 : 100 000	1 : 300 000	1 : 1 000 000
In wässeriger Lösung	6,6	·	·	·	·	520	12	910	·	·	·	·	130	·	·
	7	·	·	·	10	780	2015	2015	·	·	·	·	195	325	[illegible]
	7,8	·	·	390	260	260	910	2275	·	·	130	·	75	780	[illegible]
	8,4	·	260	1300	520	1170	1170	1235	·	·	25	390	195	390	[illegible]
	Aqua dest.	·	·	15	·	50	390	3250	·	·	·	·	·	·	[illegible]
In Eiweißlösung [1,4%][1]	6,6	2015	2275	4875	4875	14 685	9750	11 375	·	130	1425	975	9750	3250	[illegible]
	7	·	1425	6500	4875	9750	13 000	16 250	·	520	1430	520	585	1425	[illegible]
	7,8	·	1885	6500	8225	11 375	11 375	13 000	·	975	8225	6500	13 000	9750	[illegible]
	8,4	780	6500	3250	6500	6500	8225	4875	40	520	6500	8225	4875	6500	[illegible]
	Aqua dest.	·	910	4875	3250	11 375	9750	8225	·	·	3250	4875	6500	4875	[illegible]
		Bouillonkontrolle 17 875							Bouillonkontrolle 21 125						

Ringerlösung s. Tab. 9.

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* (alb.) in destilliertem Wasser, entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes, etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat, in Agargußplatte.

Ergebnis: Optimum der *Vuzin*wirkung in wässeriger und in eiweißhaltiger Lösung nach der sauren Seite der p_H orientiert.

Stärkste Hemmung durch Eiweiß.

die gefundenen Wirkungswerte im allgemeinen den in der Literatur mitgeteilten Befunden. Bemerkenswert erscheint die starke Wirkung in neutraler wässeriger Lösung, auf welche eigentlich nicht genügend hingewiesen worden ist, und welche diese zu den Chemotherapeutica gerechneten Stoffe, wenigstens hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus, mit gewissen Schwermetallen in eine Reihe treten läßt, insbesondere Sublimat und Silbernitrat. Während aber Sublimat und die Chinaalkaloide im allgemeinen durch Salze und vor allem durch Eiweiß im Lösungsmittel auch bei günstiger H- oder OH-Ionenkonzentration eine außerordentliche Einschränkung erfahren, ist Silbernitrat unter den gleichen Bedingungen noch außerordentlich wirksam bei Gegenwart von OH-Ionen; und macht sich bei ihm dies verschiedene Verhalten auch im zeitlichen Verlaufe des Effektes geltend.

Überblickt man den Einfluß der H- oder OH-Ionenkonzentration auf den Wirkungsgrad der Alkaloide, so erscheint bei Chinin und bei

[1]) s. Tab. 8.

Optochin eine relative Zunahme (gegen die Wirkungsbeschränkung durch Salze und Serumeiweiß) des desinfektorischen Effektes und der Keimverminderung zwischen p_H 7 und 8 zumal im Serum angesprochen, was die Beobachtung von *Schiemann* und *Ishiwara* über eine Verstärkung der spezifischen Wirkung des Optochins gegen Pneumokokken in aktivem Kaninchenserum (p_H 7,8) statt in inaktiviertem wohl ungezwungen erklärt. Die hier beobachteten Differenzen entsprechen den von diesen Autoren *festgestellten etwa eines Zehnfachen.* (Beim Salvarsan, welches nicht untersucht wurde, liegen die Verhältnisse vermutlich ähnlich.)

Diese Zunahme ist vielleicht zum Teil als Ringersalzwirkung bei optimalem p_H zu deuten und schließt eine Steigerung der Wirkung jenseits des indifferenten p_H 7 nach der sauren Seite nicht aus, welche auf die Mittel selbst bezogen werden muß. Möglich, daß Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 in gepufferten Lösungen diesen Indifferenzpunkt länger halten und daher nach der sauren Seite eine Abnahme der Wirkung der Mittel vortäuschen.

Vuzin aber (und wohl auch Eukupin nach den früheren Versuchen) zeigt sichtlich auf der alkalischen Seite der p_H eine fortschreitende Abnahme, nach der sauren eine Zunahme seiner Wirkung, und tritt auch hierin, bei seiner verhältnismäßig starken reinen Wirkung auf Staphylokokken, in Analogie zum Sublimat in wässerigen und eiweißhaltigen Lösungsmitteln.

Jedenfalls müssen diese Stoffe auf Grund der Vitroprüfung für die allgemeine innere Desinfektion nicht gerade besonders geeignet erscheinen, wovon spezifische Wirkungen, wie die des Chinins gegen Malariaplasmodien, des Optochins gegen Pneumokokken, des Eukupins und Vuzins gegen Streptokokken, des letzteren auch gegen Gasbranderreger, unberührt bleiben. Sprechen doch neuere Befunde dafür, daß die ätiotrope Wirkung dieser Mittel von deren jeweiliger Eintrittsfähigkeit in Zellen als undissoziierte Basen oder als dissoziierte Salze abhängt.

In mehr oder weniger dissoziiertem Zustande bzw. als Salze sollen sich diese Mittel in saurem, in undissoziiertem Zustande als Basen in alkalischem Milieu befinden. Da nun nach Untersuchungen von *Rona* und *Bloch*[1]) bei der Vergiftung von Serumlipase und der Zellatmung gefundene Gesetzmäßigkeiten zeigten, daß die Mehrzahl der Zellen nur für die Chininbase permeabel ist, in die roten Blutkörperchen aber auch das Chininsalz eindringt, so könnte man sich spezifische Wirkungen durchaus davon abhängig erklären, ob von einer gegebenen Menge des Alkaloids bei einem gegebenen p_H genügend als Base oder Salz in Wirkung treten kann. Nach den mitgeteilten Vitrobefunden müssen die Chinaalkaloide im allgemeinen (d. h. nicht in spezifischer Hinsicht!) bei saurer Reaktion des Lösungsmittels die stärkste Desinfektionswirkung gegen Mikroben entfalten, besonders Eukupin und Vuzin, welcher Fall nach *Michaelis* in entzündlichen Exsudaten (l. c.) mit 6,5 p_H gegeben wäre.

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref., 73.

Man müßte demnach den Angriffspunkt der Chinaalkaloide in entzündetes Gewebe legen, in welchem eine Dissoziationswirkung statthaben kann, d. h. die Mittel unter Steigerung der H-Ionenkonzentration der Alkaloidlösung möglichst direkt lokal anwenden. Dies ist zwar von den Chirurgen auch bisher geschehen, z. B. bei Wundspülungen, Bädern oder bei Umspritzungen von Infektionsherden, aber ohne die Konzentration der Mittel genügend herabzusetzen und durch entsprechend fördernde Lösungsmittel auszugleichen.

Acridinderivate.

Von besonderem Interesse erscheinen in diesem Zusammenhange die Acridinderivate, von welchen Trypaflavin, Rivanol und Flavicid in dieser Untersuchung herangezogen wurden. Diese Körper werden in ihrer Desinfektionswirkung in vitro etwas durch NaCl gefördert, eine Wirkung, die sich nach 24 Stunden wieder ausgleicht und in den Grenzwerten eher einer Hemmung durch NaCl Platz macht. $^{n}/_{100}$ NaOH verstärkt diese Mittel mächtig, während $^{n}/_{100}$ HCl erst nach einer gewissen Zeit kräftige Abtötung erkennen läßt. Die Wirkung dieser Mittel wird durch Serum stark eingeschränkt, doch ist aus den Tabellen 21—22 ersichtlich, daß in diesem Medium Rivanol bei p_H 7,2 des inaktiviertem Rinderserums nach 24 Stunden eine der neutralen wässerigen Lösung nahekommende Abtötung der Staphylokokken bewirkt; eine bedeutend stärkere dagegen in der mit $^{n}/_{100}$ NaOH auf etwa 8,4 p_H gebrachten alkalischen Serumverdünnung, welche hinter der entsprechenden wässerigen Lösung allerdings zurückbleibt, während die $^{n}/_{100}$ HCl, welche das Serum auf etwa 6 p_H bringt und welche in wässeriger Lösung durch Rivanol eine anfängliche Hemmung erfährt, die Rivanolwirkung im Serum vollständig aufhebt.

Ähnlich verhalten sich Flavicid und Trypaflavin (Tab. 23a).

Die Acridinverbindungen zeigen sich also in ihrer Wirkung abhängig von einer gewissen OH-Ionenkonzentration, mit deren Wachsen ihr Wirkungsgrad zunimmt, während sie durch geringe H-Ionenkonzentration in der Wirkung stark eingeschränkt bzw. aufgehoben werden. Dies macht sich in wässerigen Lösungen nur in vorübergehenden Hemmungen der Säurewirkung geltend, während in Serum, welches durch $^{n}/_{100}$ HCl nur eine verhältnismäßig geringe Senkung des p_H erfährt, die Wirkung der Acridinderivate aufgehoben wird.

Daß es ganz besonders auf die p_H ankommt, welche in wässerigem oder serösem Medium die Wirkung dieser Stoffe verstärken bzw. abschwächen, geht daraus hervor, daß bei Verwendung äquivalenter Lösungen von Na_3PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, ferner Na_2CO_3, $NaHCO_3$ die Wirkung um so geringer ist, je weniger stark die durch solche Salze, Verbindungen schwacher Säuren mit starken Basen, bewirkte OH-Ionenkonzentration

Tabelle 21. *Einfluß von NaCl, NaOH, HCl auf die Desinfektionswirkung des Rivanols gegen Staphylokokken unter Berücksichtigung des reinen Wirkungswertes.*

Lösungen		Aussaat aus Rivanolverdünnungen nach: der Beimpfung 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000	60 Minuten 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 ; 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000
•	•	79 250	81 250	81 250	81 280	81 250	81 250	40 625	60 987	60 987	61 987	61 987	71 250
n/10 NaCl	•	59 987	60 937	60 987	61 987	61 987	79 250	3337	40 625	41 625	41 625	59 987	59 987
n/10 NaCl	n/100 NaOH	•	•	246	992	1381	81 250	•	•	•	222	334	556
n/10 NaCl	n/100 HCl	79 250	81 250	81 250	81 250	81 250	81 250	32	32	1845	2225	40 625	40 625

Lösungen		240 Minuten 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000	24 Stunden 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000	7 × 24 Stunden 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000
•	•	2225	30 812	40 625	41 625	39 987	59 987	162	487	568	1800	1540	1870	•	•	•	•	•	8
n/10 NaCl	•	2114	3337	3394	39 625	40 625	41 625	162	325	894	1540	5690	8125	•	•	•	•	•	40
n/10 NaCl	n/100 NaOH	•	•	•	•	1	1	•	•	•	1	1	1	•	•	•	•	•	•
n/10 NaCl	n/100 HCl	•	•	2	2	2	3	•	•	•	19	•	•	•	•	•	•	•	•

Einsaat: 0,1 ccm **24** stündiger Bouillonkultur von *Staphylokokken* (= 81 250 000 Keime) in je 5 ccm der Ansätze. — *Aussaat:* 0,1 ccm (= 1/50 der Einsaat) in Agargußplatten. (Die Zahlen geben Tausende der Einsaat an.) — *Ergebnis:* Praktische Wirkungslosigkeit des Rivanols in neutraler, wässeriger Lösung, geringe Verstärkung durch Kochsalz, mächtige durch NaOH, keine durch HCl. (Siehe Tab. 22.)

Tabelle 22. *Einfluß schwach alkalischer und saurer Kochsalzlösung auf die Desinfektionswirkung des Rivanols gegen Staphylokokken in wässeriger Lösung und in Rinderserum (1 : 2), unter Berücksichtigung des reinen Wirkungswertes.*

	Lösungsmittel		Aussaat aus Rivanolverdünnungen nach: der Beimpfung 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000	1 : 320 000	Kontrolle	4 Stunden 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000	1 : 320 000	Kontrolle	24 Stunden 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 80 000	1 : 160 000	1 : 320 000	Kontrolle
In wässeriger Lösung	•	•	2437	2437	2844	2975	3179	3179	3656	4144	375	406	478	650	1950	1950	2844	3087	•	•	81	81	162	487	1300	4875
	n/10 NaCl	n/100 NaOH	243	406	406	375	650	741	975	2600	•	•	2	6	19	409	487	3006	•	•	•	•	•	5	•	3900
	n/10 NaCl	n/100 HCl	975	1869	1950	1950	2437	2437	3612	3612	81	33	5	6	32	16	49	52	•	•	•	•	•	•	•	•
In Rinderserum (1 : 2) 7,2 (p_H)	•	•	2762	2762	2844	2925	3006	3178	3906		1137	2600	2296	3260	2925	3087	3906		•	9	245	975	1625	1381	2356	
	n/10 NaCl	n/100 NaOH	1950	2437	2681	2762	2762	2844	2844		894	2184	2295	2296	2762	2844	3087		•	•	•	81	484	812	1368	
	n/10 NaCl	n/100 HCl	2281	2762	2975	2925	3006	3087	3189		1950	2215	2762	2925	2844	3087	3906		975	975	2356	2437	2356	3087	3900	
			Bouillonkontrolle 3612 (500)								Bouillonkontrolle 4875 (000)								Bouillonkontrolle ∞							

Einsaat: 0,1 ccm 24stündiger Bouillonkultur von *Staphylokokken* in je 5 ccm der Ansätze. — *Aussaat:* 0,1 ccm (= 1/50 der Einsaat) in Agargußplatten. (Die Zahlen bedeuten Tausende der Aussaat.) — *Ergebnis:* Wie Tab. 21: Geringe Wirkung in Wasser, mächtige Verstärkung durch Lauge, nicht durch Säure, geringe Wirkung in Serum (inaktiviert), starke in Serum und Lauge (8 p_H), keine (bei 6 p_H) durch HCl.

Tabelle 23. *Vergleich der Desinfektionswirkung von Rivanol in alkalischen Kochsalz- und Ringerlösungen, in Wasser und 50 proz. Rinderserum.*

	Lösungsmittel		Aussaat nach 24 Std.							Aussaat n. 8 × 24 Std.						
			1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 80 000	1 : 100 000	1 : 800 000	1 : 1 000 000	1 : 1000	1 : 8000	1 : 10 000	1 : 80 000	1 : 100 000	1 : 800 000	1 : 1 000 000
In wässeriger Lösung	NaCl 0,85%	·	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+
	desgl.	$^{n}/_{100}$ $NaHCO_3$	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+
	"	$^{n}/_{100}$ NaOH	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	Ringer	·	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+
	"	$^{n}/_{100}$ $NaHCO_3$	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+
	"	$^{n}/_{100}$ NaOH	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
In 50% Rinderserum[1])	NaCl 0,85%	·	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+
	"	$^{n}/_{100}$ $NaHCO_3$	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	±	+	+	+
	"	$^{n}/_{100}$ NaOH	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+
	Ringer	·	+	+	+	+	+	+	+	−	−	±	+	+	+	+
	"	$^{n}/_{100}$ $NaHCO_3$	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+
	"	$^{n}/_{100}$ NaOH	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+

Einsaat: **0,1 ccm 24stündiger Bouillonkultur von *Staphylokokken* in je 4 ccm der Ansätze.**

Aussaat: Eine Öse (= $^1/_{2000}$ der Einsaat) in je 2,5 ccm Traubenzuckerbouillon.

Ergebnis: Geringe Wirkung in NaCl-Lösung, starke in alkalischer NaCl-Lösung, schwächere in alkalischer Ringerlösung.

Hemmung durch Eiweiß, sonst wie vor.

Tabelle 23a. *Vergleich der Desinfektionswirkung von Flavicid in verschiedenen Lösungsmitteln unter Berücksichtigung insbesondere von Natriumbicarbonat und Natronlauge sowie des Einflusses von Kochsalz auf die Steigerung der Desinfektionswirkung, in wässeriger Lösung.*

Lösungsmittel		Aussaat nach 4 Std.							Aussaat nach 18 Std.							Aussaat nach 42 Std.						
		1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 80 000	1 : 100 000	1 : 800 000	1 : 1 000 000	1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 80 000	1 : 100 000	1 : 800 000	1 : 1 000 000	1 : 1000	1 : 8000	1 : 10 000	1 : 80 000	1 : 100 000	1 : 800 000	1 : 1 000 000
·	·	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
·	$^{n}/_{100}$ $NaHCO_3$	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	+	+
·	$^{n}/_{100}$ NaOH	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
NaCl (0,85%)	·	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
desgl.	$^{n}/_{100}$ $NaHCO_3$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+
"	$^{n}/_{100}$ NaOH	−	−	−	−	±	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Einsaat: 0,1 ccm 24stündiger Bouillonkultur von ***Staphylokokken*** **in je 4 ccm** der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse (= $^1/_{2000}$ der Einsaat) in je 2,5 ccm **Traubenzuckerbouillon.**

Ergebnis: Flavicid wie Rivanol: Geringe bzw. **keine Wirkung in wässeriger** oder NaCl-Lösung, Steigerung durch Alkalien und durch **Alkali = Salz (besonders** NaOH/NaCl).

[1]) Bei den Salzzusätzen ist berücksichtigt, daß **das Serum die Hälfte des** Salz- bzw. Ringeransatzes schon enthält. (Ringerlösung **s. Tab. 9.)**

ist, was sich besonders im Serum geltend macht, in welchem, durch die Pufferwirkung der Elektrolyte und Kolloide, die Verschiebungen der p_H durch die zugesetzten Salze nur geringe sind.

Die Farbstoffe der Acridingruppe unterscheiden sich demnach von den bisher untersuchten Desinfektionsmitteln durch ihre verhältnismäßig außerordentlich geringe bzw. langsame Wirkung in elektrolytfreien oder kochsalzhaltigen, wässerigen Lösungen, d. h. durch die mangelnden reinen Wirkungswerte.

Der Zusatz von Serum setzt in diesem Falle die Wirkung in der Tat nicht herab, sondern steigert sie vermittels seiner Elektrolyte und einer, wenn auch nur geringen OH-Ionenkonzentration. Im ganzen wirkt Serum doch beeinträchtigend, bei gleichen p_H Ringersalze stärker als NaCl; NaCl bei $^n/_{100}$ $NaHCO_3$ hemmend, bei $^n/_{100}$ NaOH fördernd auf die Farbstoffwirkung (Tab. 23).

Werden fallende Konzentrationen, z. B. von Flavicid (Tab. 24), in einer Ringereiweißlösung von reihenweise steigenden p_H in der desinfektorischen Wirkung verglichen, so ergibt sich eine steigende Reihe von praktischer Wirkungslosigkeit bei 6,6 und 7 p_H zu kräftiger absoluter Desinfektion und weitreichender relativer Keimverminderung bei 7,8 und 8,4 p_H [1]).

Auffallend ist die verhältnismäßig starke Abtötung in der salzfreien neutralen Eiweißlösung, während aus den übrigen Tabellen ersichtlich

Tabelle 24. *Einfluß verschiedener p_H auf die Desinfektionswirkung abgestufter Konzentrationen von Flavicid in Ringerlösung (s. Tab. 9 u. a.) und in elektrolytfreiem Eiweiß (Albumin-Pseudoglobulin, s. Tab. 8 u. a.), nach Ringer besalzen.*

p_H	Aussaat nach 4 Stunden							Aussaat nach 24 Stunden						
	1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 30 000	1 : 100 000	1 : 300 000	1 : 1 000 000	1 : 1000	1 : 3000	1 : 10 000	1 : 30 000	1 : 100 000	1 : 300 000	1 : 1 000 000
6,6	910	1300	1495	1625	3250	3250	8225	1300	910	8225	8225	9750	11 375	16 250
7	1495	1195	2080	1235	1645	3250	6500	30	520	1425	6500	8225	14 685	17 875
7,8	910	910	910	1430	1105	1235	3250	·	50	650	2080	3250	4875	16 250
8,4	100	390	520	910	·	520	910	·	·	·	20	390	3575	16 250
Aqua dest.	1670	650	715	1170	1195	1625	1670	·	·	·	1195	3250	4875	14 685
	Bouillonkontrolle 4875							Bouillonkontrolle 17 875						

Einsaat: Aufschwemmung von *Staphylokokken* in destilliertem Wasser, entsprechend 0,01 ccm 24stündiger Bouillonkultur in je 4 ccm der Ansätze.

Aussaat: Eine Öse des Ansatzes, etwa $^1/_{2000}$ der Einsaat, in Agargußplatten.

Ergebnis: Wirkungslosigkeit in schwach saurer bzw. neutraler Lösung, mächtige Steigerung mit Zunahme der OH.-Konzentration.

---

[1]) *Anmerkung bei der Korrektur:* Die Versuche von *Bloch* und *Schiff* (Biochem. Zeitschr. 1923, **138**.) über den Einfluß der (H˙) auf die Wirkung des Rivanols sind mir erst jetzt bekannt geworden.

ist, daß die Acridinfarbstoffe in neutralem Serum wie in neutraler wässeriger Lösung keine oder nur sehr geringe und erst nach längerer Zeit hervortretende Wirkung entfalten. Vielleicht ist darin eine Wirkung der geringen Mengen Natronlauge zu erblicken, welche dem elektrolytfreien Albuminpseudoglobulingemisch (s. Fußnote Tab. 8) zur Neutralisation zugesetzt wurden (von 6,4 auf 7 p_H), und welche gegen das Albumin des Eiweißes die Eigenschaft einer starken Base wahren.

So erklärt sich zwanglos die von *Schiemann* und *Baumgarten* beobachtete Wirkungssteigerung von Trypaflavin durch frisches, normales Serum, welches mit 7,6—7,8 p_H gegen 7,2 des inaktivierten eine bedeutende Steigerung der allgemeinen Wirkung der Mittel dieser Gruppe als Farbstoffbasen verursachen muß, wobei die natürliche Baktericidie des Serums, welche zum Teil wenigstens als die Wirkung der Ringersalze in diesem optimalen p_H-Bereich gedeutet wurde, vermutlich eine Verstärkung im Sinne eines Katalysators erfährt.

(Die von *Schiemann* und *Ishiwara* beobachtete umgekehrte Erscheinung beim Sublimat dagegen erklärt sich aus der Gegenwart freier OH-Ionen und deren hemmender Wirkung, welche in fast neutralem, inaktiviertem Serum [7—7,2 p_H] fehlt.)

Während nun *Hailer* die starke Giftigkeit minimaler Konzentrationen des Quecksilbers in ihrer Dauerwirkung auf kolloidale Verteilung des Giftes und eine stöchiometrisch verlaufende Reaktion mit affinen Gruppen der Zellen analog den Verhältnissen bei den höheren Homologen des Hydrochinins beziehen möchte, ist ein entsprechender Fall auch bei den Acridiniumderivaten gegeben. Man könnte aber gerade bei dieser Gruppe noch eine andere Analogie hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus ziehen, nämlich mit den Antikörpern.

Während die übrigen in ihrem Verhalten in verschiedenen Lösungsmitteln beschriebenen Mittel, vor allem auch die höheren Homologen des Chinins aus stärkster und schnellster Wirkung in wässerigen Lösungen (reiner Wirkungswert) durch Elektrolyte und Eiweiß im ganzen stark und meist in außerordentlichem Grade eingeschränkt werden, zeigen sich die Acridinderivate, vor allem Rivanol, in sauren bis neutralen wässerigen Lösungen an sich praktisch wirkungslos[1]), durch Alkali und Salze überhaupt erst in ihrer Wirkung entfaltet und gefördert, in den engeren Grenzen des Wirkungsmilieus der Antikörper, in Serum, wie diese etwas gehemmt und finden in den Lösungsverhältnissen des normalen Blutes für die Aktivierung einer hohen Wirkung zureichende Bedingungen.

---

[1]) Gleichwohl kommt es auch in neutralen wässerigen Lösungen zur Bindung der Mittel an Mikroben, wie der bald einsetzende Virulenzsturz pathogener Mikroben erweist, welcher sich im vergleichenden Desinfektions- und Infektionsversuch bei genauer Keimzählung ergibt. Siehe Tierversuch! Auch in vitro kommt es dabei allmählich zur Abtötung noch in hohen Verdünnungen (Tab. 25).

Tabelle 25. *Vergleichende Prüfung der abtötenden Wirkung von Rivanol auf Streptokokken durch den Kultur- und Tierversuch unter Berücksichtigung verschiedener Lösungsmittel und der Einwirkungszeit des in denselben gelösten Desinfektionsmittels.*

Rivanollösung (1 : 100 000). Zeit der Entnahme nach Beimpfung mit Streptokokken	In physiologischer NaCl-Lösung		In physiologischer NaCl-Lösung entspr. n/100 NaOH	
	Keimzahl	Virulenz bei Mäusen	Keimzahl	Virulenz bei Mäusen
1 Min.	1 200 000	+ 26 Std.	900 000	+ 46 Std.
4 „	1 200 000	+ 50 Std.	900 000	+ 40 „
16 „	1 000 000	+ 40 Std.	700 000	munter, lebt
1 Std.	600 000	n. 40 Std. schw. kr. nach 5 Tg. erholt	200	„ „
4 „	500	munter, lebt	•	„ „

Die Röhrchen enthalten 4,5 ccm Rivanollösung + 0,5 ccm einer 5fach verdünnten 24stündigen Bouillonkultur von *Streptokokken* (Stamm *Aronson*, Virulenz 1 : 10 000 000). Aus jedem Röhrchen werden nach 1, 4, 16, 60 und 240 Min. 0,1 ccm (= 0,002 ccm Kultur = 1 000 000—2 000 000 Keime) zu Ascitesagarplatten gegossen und 0,1 ccm Mäusen ip. eingespritzt.

Ergebnis: Verstärkung des Virulenzsturzes bei Streptokokken durch Einwirkung alkalischer statt wässeriger Rivanollösung.

Auch die Antikörper sind in ihrem Antigen-Bindungsvermögen von Elektrolyten (*Bordet*) und in quantitativer Beziehung von bestimmten Lösungsverhältnissen und deren Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Reaktionen abhängig, wobei die Affinitäten der Reagenzien bzw. deren mutmaßliche chemische Konstitution eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen.

Es sei hier nur an *Morgenroths* Untersuchungen[1]) „über die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin" erinnert, in welchen er die von *Dreyer* und *Madsen* festgestellten Differenzen im Verhalten verschiedener Tierarten gegen neutrale Gemische von Toxin und Antitoxin (Verdünnungsphänomen) mit der *Ehrlich*schen Grundanschauung einer strengen Quantität der Bindungsverhältnisse, wenn die zeitlichen Verhältnisse der Bindung berücksichtigt wurden, in Übereinstimmung bringen konnte.

Ungermann und *Kandiba*[2]) stellten in eingehenden Untersuchungen fest, daß ein Wechsel des Mediums von Kochsalzlösung zu Serum oder Zellsuspensionen die Bindungsverhältnisse zwischen Antikörpern und Antigenen vollständig ändert, wobei die Reaktionen dann nicht mehr streng quantitativen Bedingungen der Bindung, also absoluten Mengen, sondern überwiegend der Konzentration entsprechen.

Aus der verschiedenen Reaktionsfähigkeit von Antitoxinen und Toxinen, vor allem der mehr oder weniger aktivierenden Wirkung des

[1]) Zeitschr. f. Hyg. 48. 1904.

[2]) A. K. G. A. 40. 1912.

Serums auf die verschiedenen Toxine [*de Waele*[1]), *Dold* und *Ungermann*[2])] und deren Avidität oder Trägheit (Hemmung infolge möglicher anderweitiger Bindung reversibler Mengen im Serum?), also aus den Affinitäten lassen sich nach *Ornstein* und *Müller*[3]) die eigenartigen Bindungsverhältnisse erklären, welche Toxine und Antitoxine bei getrennter Einverleibung in den Tierkörper erfahren, wobei zur Neutralisation steigender Toxinmengen, z. B. bei dem langsam reagierenden Botulismustoxin bedeutend, bei dem avideren Diphtheriegift relativ weniger, bei dem höchst aviden Schlangengift dagegen bedeutend mehr Antitoxin verbraucht wird, ja nach wenigen Multipla der einfachen Giftdosis überhaupt eine Entgiftung nicht mehr möglich erscheint.

Auch der Säuredissoziation neutraler Toxin-Antitoxingemische, durch welche *Morgenroth* bei Einwirkung von Salzsäure aus der Verbindung des Kobrahämolysins mit seinem spezifischen Antitoxin noch nach langer Bindungszeit das Antitoxin unter Abspaltung des Toxins in Form des Lecithins wiedergewinnen und damit den fehlenden Nachweis der chemischen Bindung durch Restitution der Komponenten aus der neutralen Verbindung erbringen konnte, kann hier gedacht werden. Daß die Ursache der oben erwähnten Differenzen der Toxin-Antitoxinbindungsverhältnisse wahrscheinlich im chemischen Charakter der betreffenden Toxine zu suchen ist, war schon nach *Morgenroths* Feststellung der Hitzbeständigkeit der bei der Säuredissoziation erhaltenen Schlangengiftmodifikation, bei welcher das Antitoxin zerstört wird, zu erwarten. Diese Annahme hat neuerdings eine wesentlich breitere Grundlage durch die Mitteilung *Hallauers* erfahren, welcher in Fortsetzung alter Versuche und Ideen *Doerrs* fand, daß die Säureentgiftung des Diphtherietoxins, welche zugleich dessen antigene Natur aufhebt, als Funktion der H-Ionenkonzentration und der Einwirkungszeit zwischen den Werten 1—0 bei Neutralisation durch Alkali reversibel erscheint. *Hallauer* läßt „die Säureinaktivierung des Toxins auf einer intramolekularen Umlagerung der Ringsysteme in offene Ketten beruhen“, wobei er auf die mögliche Bedeutung der aromatischen Kerne von cyclischer Atomgruppierung hinweist.

Zusammenfassung.

Zahlreiche Versuche zur Prüfung von Desinfektionsmitteln und von sogenannten Chemotherapeutica ergaben, daß deren Wirkung von bestimmten Lösungsbedingungen wesentlich abhängig ist. Es wurde dabei gezeigt, daß schon in vitro weitgehende Anhaltspunkte für die Wirkung auf pathogene Erreger unter den Bedingungen des gesunden oder kranken Organismus gewonnen werden können.

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **3.**
[2]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **11.**
[3]) Zeitschr. f. Hyg. **75.** 1913.

Es konnten dabei folgende Feststellungen gemacht werden:

1. Anorganische Säuren bzw. Basen und entsprechend wirkende Salze werden noch in hohen Verdünnungen ($^n/_{100}$ — $^n/_{1000}$) durch Neutralsalze in geeigneten Kombinationen höchst wirksam in ihrem keimtötenden Vermögen verstärkt.

Ähnliche Desinfektionswirkungen lassen sich auch in Ringerlösung feststellen mit einem charakteristischen eng umgrenzten Optimum, welches auch bei Eiweißgegenwart angedeutet ist (7—8 p_H).

Die Bactericidie normalen Blutserums beruht wahrscheinlich zu einem wesentlichen Teile auf der eigenartigen Verteilung der anorganischen Elektrolyte und der Serumkolloide, bei einer im gesunden Organismus stets regulierten geringen OH-Ionenkonzentration.

Entsprechenden, variierten Bedingungen in vitro unterworfen lassen sich Desinfektionsmittel in ihrer Wirkung prüfen und in ihren optimalen Wirkungsbedingungen weitgehend charakterisieren. So wurde gefunden:

2. Von den Schwermetallsalzen wirkt das Silbernitrat in schwach alkalischen Salzlösungen von geringer OH-Ionenkonzentration fast so stark wie in reiner wässeriger Lösung, besonders bei Gegenwart von Eiweiß.

Die optimale Wirkung des Silbernitrats fällt mit dem p_H-Optimum der Ringerlösung zusammen (7,8 p_H). In Eiweißringerlösung geht diese Abhängigkeit von einer bestimmten OH-Ionenkonzentration so weit, daß in neutralem oder schwachsaurem Medium (7—6,6 p_H) die Wirkung des Silbers fast aufgehoben erscheint (AgCl), während sie mit zunehmender Alkalescenz wächst und dem reinen Wirkungswert nahekommt.

Quecksilberchlorid und Kupfersulphat finden ihre optimale Wirkung in saurem Medium und werden durch Eiweiß, trotz Verstärkung des Kupfers durch Salze, nivellierend herabgedrückt.

3. Die Chininderivate ähneln in ihren reinen Wirkungswerten den Schwermetallsalzen und werden, wie diese, durch Elektrolyte mehr oder weniger, vor allem aber durch Eiweiß, außerordentlich in ihrer Wirkung herabgedrückt:

Chinin wirkt in Ringerlösung absolut optimal zwischen 7 und 7,8 p_H. Die relative Keimabnahme nimmt dagegen nach der sauren Seite der p_H (6,6) zu. In Ringereiweißlösung ist eine sehr geringe, mit der OH-Ionenkonzentration steigende Wirkung angedeutet.

Optochin zeigt ein umgrenztes Optimum der Wirkung in Ringerlösung bei 7,8 p_H, aber auch wiederum kräftige Verstärkung auf der sauren Seite der p_H. In Ringereiweißlösung ist eine sehr schwache der p_H-Reihe angepaßte Wirkungssteigerung deutlich.

Vuzin und Eukupin sind in ihren optimalen Wirkungen nach der sauren Seite der p_H orientiert. Vuzin erreicht in Ringerlösung bei 6,6 p_H seine reine Wirkung. Auch in Ringereiweißlösung erscheint das ums 100- bis 1000fache herabgesetzte Optimum nach p_H 7—6,6 ausgesprochen.

4. Die Acridinderivate Rivanol, Flavicid und Trypaflavin zeigen (ähnlich wie Silberchlorid) in neutraler wässeriger Lösung und in inaktiviertem Serum schlechte bzw. sehr langsame Wirkung, welche durch geringe saure Reaktion in eiweißhaltigem Medium aufgehoben wird. Sie sind abhängig von einer geringen OH-Ionenkonzentration, mit deren Steigen ihr Wirkungsgrad mächtig zunimmt.

5. Den mangelnden reinen Wirkungswert, die Abhängigkeit von einer minimalen OH-Ionenkonzentration und die verhältnismäßig geringe Herabsetzung der Wirkung durch Eiweiß haben die Farbstoffe mit dem Silberchlorid gemein. Ein allgemeiner, grundsätzlicher Unterschied zwischen den Wirkungsmechanismen der Desinfektionsmittel und der Chemotherapeutica erscheint nach den mitgeteilten Versuchen, abgesehen von der Größe der in Wirkung tretenden Molekularkomplexe, nicht gegeben.

6. Die Acridinpräparate lassen hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus eine Analogie mit den Antikörpern nicht von der Hand weisen.

7. Da nun der Organismus selbst, zumal im Falle der Entzündung und bei gewissen Allgemeinerkrankungen, örtlich sowohl als allgemein recht mannigfache Abweichungen von den Normen seiner Lösungsbedingungen in Blut und Geweben darbieten kann, so kann die Schaffung vor allem normaler Wasserstoff-Ionenkonzentration Aufgabe des praktischen Vorgehens sein und würde durch geeignete, je nach örtlicher oder allgemeiner innerer Anwendung, mehr oder weniger äquilibrierte Salzlösungen entsprechender OH-Ionenkonzentration zu erreichen sein.

Diese Unterstützung der normalen Bactericidie des Organismus, welche zur lokalen und allgemeinen Ionenregulierung im Elektrolythaushalt des Organismus geeignet erscheint, kann auch zur Schaffung eines geeigneten Milieus wirksamer Anwendung von Desinfektionsmitteln dienen, um diesen optimale Wirkung zu sichern.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.
Vorsteher: Prof. *R. Doerr.*)

Über die Latenzperiode der passiven Anaphylaxie des Meerschweinchens.

Von
R. Doerr und L. Bleyer.

Der anaphylaktische Zustand läßt sich, wie zuerst *Otto* gezeigt hat, mit dem Serum aktiv sensibilisierter Tiere auf normale übertragen; *Spender* und *Empfänger* des Serums können derselben oder verschiedenen Tierspezies angehören (*homologe* oder *heterologe passive Anaphylaxie*). Träger der passiv präparierenden Serumwirkung ist ein Antikörper, den man als *anaphylaktischen Antikörper* oder *anaphylaktischen Reaktionskörper* bezeichnet; er entsteht durch parenterale Vorbehandlung (Immunisierung) mit bestimmten Eiweißantigenen (Anaphylaktogenen) *und wird — wie alle Antikörper — durch diese Antigene in vitro gebunden* (*neutralisiert*) d. h. *seiner passiv präparierenden Wirkung beraubt.* Ein Beispiel mag diese abstrakten Begriffe fixieren.

Versuch 1.

Kaninchen Z_{26} erhält mehrere intravenöse Injektionen eines für diesen Zweck beliebig ausgewählten Anaphylaktogens (**Schweineserum**). 8 Tage nach der letzten Einspritzung wird Z_{26} aus der Carotis entblutet und das Serum aus dem Aderlaßblut abgeschieden. Das gewonnene *Immunserum* enthielt anaphylaktischen Antikörper, dessen Wirkungsstärke in der von *Doerr* und *Russ* vorgeschlagenen Weise austitriert wird: Eine Reihe normaler Meerschweinchen von 250 g Körpergewicht werden *mit je 0,5 ccm des Serums von* Z_{26} (plus 1,5 ccm physiol. NaCl-Lösung) *passiv heterolog und zwar intraperitoneal vorbehandelt* und nach 48 Stunden mit fallenden Dosen Schweineserum *in die linke Jugularvene* reinjiziert. Es ergab sich:

Reinjektionsdosis	Erfolg
0,2 ccm Schweineserum iv.	+ 2 Min.
0,1 ,, ,, ,,	+ 3 ,,
0,05 ,, ,, ,,	+ 5 ,,
0,02 ,, ,, ,,	+ 6 ,,
0,01 ,, ,, ,,	protr. Symptome, überlebt
0,005 ,, ,, ,,	deutliche, aber leichte S., überlebt
0,002 ,, ,, ,,	fast Null

Die akut letale Dosis Schweineserum betrug somit für die mit 0,5 ccm Serum Z_{26} heterolog passiv sensibilisierten Meerschweinchen **0,02 ccm.**

Nun wurden je 0,5 ccm S. Z_{26} mit fallenden Mengen Schweineserum im Reagensglase versetzt, die Gemenge 2 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten und jedes der Gemische einem normalen Meerschweinchen intraperitoneal eingespritzt; nach 48 Stunden intravenöse Reinjektion mit 0,2 ccm Schweineserum zwecks Prüfung der vorhandenen Hypersensibilität:

Vorbehandlung mit	Ergebnis der Reinjektion
0,5 ccm Serum Z_{26} + 0,2 ccm Schweineserum	0
0,5 „ „ + 0,1 „ „	0
0,5 „ „ + 0,02 „ „	0
0,5 „ „ + 0,01 „ „	0
0,5 „ „ + 0,005 „ „	0
0,5 „ „ + 0,002 „ „	0
0,5 „ „ + 0,001 „ „	0
0,5 „ „ + 0,0005 „ „	0
0,5 „ „ + 0,00025 „ „	protr. S., + 11 Min., Lungenödem
0,5 „ „ + 0,0001 „ „	+ 3 Min.

Zur Neutralisierung des in 0,5 ccm Serum Z_{26} vorhandenen anaphylaktischen Antikörpers waren somit im Reagensglase **nur 0,0005 ccm** *Antigenlösung* (*Schweineserum*) erforderlich; dagegen benötigte man mindestens **0,02 ccm,** *also das 40fache Quantum*, um bei einem mit der gleichen Dosis Immunserum präparierten Meerschweinchen einen akut letalen Schock hervorzurufen. Doch könnten natürlich an dieser recht auffälligen Differenz die so verschiedenen Bedingungen Schuld sein, unter denen man die beiden Komponenten (Antikörper und Antigen) in vitro und in vivo abreagieren läßt; es liegt zunächst noch kein Grund zu der Annahme vor, daß die bloße Neutralisierung des Antikörpers durch das Antigen nicht genügt, um den Organismus, in welchem sie abläuft, intensiv zu schädigen. Diese Annahme wird aber sofort zur Gewißheit, wenn wir den passiv präparierten Meerschweinchen nicht die akut letale Antigendosis (im vorliegenden Falle 0,02 ccm), sondern einen entsprechenden *Bruchteil* derselben intravenös injizieren, oder wenn wir zwar die Gesamtmenge in die Blutbahn bringen, aber nicht innerhalb eines ganz kurzen Zeitintervalles, sondern in sehr stark verlangsamtem Tempo oder auf mehrere kleine Einzelinjektionen verteilt („in refracta dosi"); die Meerschweinchen gehen dann nicht im akuten Schock ein, ja sie zeigen nicht einmal deutliche krankhafte Symptome; nichtsdestoweniger wurde der Antikörper neutralisiert, denn die Tiere erweisen sich als desensibilisiert, sie reagieren auf eine nochmalige intravenöse Zufuhr selbst großer Antigenquanten ebensowenig wie normale Exemplare. Das Zustandekommen einer maximalen pathogenen Auswirkung hängt also sicher nicht nur davon ab, daß *der Antikörper neutralisiert wird*, sondern wird durch *die besonderen Verhältnisse, unter denen sich diese Neutralisierung vollzieht*, entscheidend beeinflußt. Die genaue und lückenlose Ermittlung dieser Verhältnisse

muß den Grundpfeiler jeder Theorie bilden, welche eine befriedigende Erklärung des Mechanismus der anaphylaktischen Phänomene geben will. In richtiger Würdigung dieses Postulates hat man denn auch versucht, *die Bedingungen des passiv anaphylaktischen Experimentes* in zeitlicher, qualitativer und quantitativer Beziehung in der mannigfachsten Weise zu variieren und ist dabei zu einer Reihe bemerkenswerter Ergebnisse gelangt, die uns in der Folge noch beschäftigen werden. Zunächst sei eine Vorfrage diskutiert, die bisher noch keine Beachtung gefunden hat.

Als Anaphylaktogene hat man bis in die jüngste Zeit *artfremde Sera* d. h. Blutsera anderer Tierspezies benützt. Man wußte zwar, daß Blutserum außer verschiedenen Eiweißstoffen auch noch andere Bestandteile enthält, nahm aber stillschweigend an, daß für die anaphylaktogene Funktion *nur die Proteine* in Betracht kommen und definierte dementsprechend die Anaphylaxie als eine „*Eiweiß-Antieiweiß-Reaktion*". Im Blutserum findet man aber auch *Lipoide* und zwar *antigene Lipoide*. Immunisiert man daher beispielsweise ein Kaninchen mit Schweineserum, so erhält man nicht nur spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Eiweißverbindungen des Schweineserums, sondern auch solche, welche auf Schweineserumlipoid eingestellt sind (*Antilipoide*); ein auf diese Weise gewonnenes Immunserum repräsentiert also ein *Antikörpergemisch* und wird in vitro und in vivo mit dem zugehörigen *Antigengemenge* (Schweineserum) sowohl *Eiweiß-Antieiweiß-Reaktionen* wie auch *Lipoid-Antilipoid-Reaktionen* liefern. *Friedberger* konnte erst kürzlich den direkten Nachweis erbringen, daß sich diese beiden Reaktionsformen im Präcipitationsversuch optisch (Doppelringbildung) und durch die Löslichkeitsverhältnisse der entstehenden Niederschläge voneinander unterscheiden bzw. abtrennen lassen. Man wird daher, falls man nicht mit chemisch einheitlichen und lipoidfreien Eiweißkörpern, sondern mit artfremdem Serum experimentiert, die *Möglichkeit* zugestehen müssen, daß es sich auch bei den anaphylaktischen Versuchsanordnungen um eine Lipoid-Antilipoid-Reaktion handelt. Dazu kommt noch ein weiteres Moment. Ein dem anaphylaktischen Schock vollkommen gleichwertiger Symptomenkomplex kann de facto erzeugt werden, wenn man im Organismus bestimmter Tierarten (Meerschweinchen, Hunde, Hühner) eine Lipoid-Antilipoid-Reaktion in Gang bringt (*Forssmann*, *Doerr* und *R. Pick*, *Sordelli*, *Wernicke* und *Pico*, *Landsteiner* und seine Mitarbeiter u. a.); daß für diese sog. „*inverse Anaphylaxie*" zum Teil eigenartige Faktoren (Zellständigkeit des lipoiden Antigens) maßgebend sind, ist kein Argument, welches die Untersuchung der Bedeutung der Serumlipoide für den Mechanismus der Serumanaphylaxie als überflüssig erscheinen lassen würde.

Um in diesem Punkte Klarheit zu schaffen, prüften wir, *ob sich der anaphylaktische Antikörper des Immunserums von Kaninchen* Z_{26}

durch die isolierten Lipoide aus Schweineserum in vitro absättigen läßt oder nicht. Lipoide sind in absolutem Alkohol löslich; sie verwandeln sich bei dieser Art der Darstellung zwar in „*Haptene*“ (*Landsteiner*) d. h. sie büßen *die aktiv immunisierende Wirkung* ein, bewahren aber das *spezifische Bindungsvermögen.* Auf diese Voraussetzungen gestützt, wurde der nachstehende Versuch angesetzt.

Versuch 2.

Je 100 ccm *Schweineserum* und (zur Kontrolle) *Pferdeserum* wurden mit der *4fachen Menge abs. Alkohols* ausgefällt. Nach eintägigem Stehen wurde der Alkohol abfiltriert und zur Seite gestellt. Der Filterrückstand wurde sorgfältig gesammelt, getrocknet und nochmals mit einer kleineren Menge (100 ccm) abs. Alkohols ausgezogen; die abfiltrierte Extraktionsflüssigkeit wurde mit der 1. Alkoholportion vereint, das Gemisch im Wasserbade durch Abdampfen vom Alkohol befreit und der gewonnene schmierige Rückstand (der die Serumlipoide enthielt) in je 10 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung fein und homogen emulgiert. 0,1 ccm dieser Lipoidemulsionen entsprach 1 ccm Vollserum.

Nun erfolgte vorerst eine nochmalige *Titerbestimmung des passiv präparierenden Antikörpers im Serum des Kaninchens Z_{26}*, jedoch nicht nach der in der 1. Versuchsserie benützten Methode, sondern in der Weise, daß mehrere Meerschweinchen mit fallenden Mengen des Immunserums intraperitoneal vorbehandelt und nach 48 Stunden mit einer größeren Dosis (0,2 ccm) Antigenlösung (Schweineserum) intravenös reinjiziert wurden. Diese Variante der Auswertung anaphylaktischer Antikörper stammt gleichfalls von *Doerr* und *Russ* her; sie bot für den angestrebten Zweck gewisse Vorteile.

Dosis des ip. injizierten, passiv präparierenden Serums Z_{26}	Erfolg der intravenösen Reinjektion einer konstant gehaltenen, größeren Dosis Schweineserum
1,0 ccm	+ 3 Min.
0,5 „	+ 2 „
0,25 „	+ 3 „
0,1 „	schwere protrahierte Symptome; überlebt
0,05 „	transitorisch-bronchospastischer Schock; erholt sich rasch und überlebt

0,25 ccm Serum Z_{26} *vermochten somit gegen 0,2 ccm Schweineserum maximale passive Hypersensibilität zu erzeugen.*

Nun wurden 2 Gemische hergestellt, und zwar enthielt das eine *2 ccm Serum Z_{26} + 17,6 ccm NaCl-Lösung + 0,4 ccm Schweineserum-Lipoidemulsion,* das zweite hatte die gleiche Zusammensetzung, nur wurde statt des Schweineserumlipoids *Lipoid aus Pferdeserum* zugesetzt. Die Gemische blieben 2 Stunden in einem Wasserbade von 37°, dann 1 Stunde an der Luft bei Zimmertemperatur stehen und wurden sodann durch feuchte, dichte Papierfilter unter wiederholtem Aufgießen der ersten Filtratportionen filtriert, bis die Flüssigkeit fast vollständig klar abtropfte; eine möglichst exakte Entfernung der Lipoidteilchen schien uns notwendig, schon aus dem Grunde, weil Lipoide die anaphylaktischen Reaktionen antagonistisch beeinflussen können. (Vorversuche hatten uns überzeugt, daß die Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßregel in der Tat eine starke Abschwächung des Antikörpers durch das spezifische Serumlipoid vorzutäuschen vermag.) In den Filtraten wurde schließlich der Gehalt an anaphylaktischem Antikörper in derselben Art austitriert wie im unveränderten Vollserum, wobei natürlich dem

Umstande Rechnung getragen werden mußte, daß 1,0 ccm Filtrat infolge der vorgenommenen 10fachen Verdünnung nur 0,1 ccm Vollserum gleichzusetzen war.

Die Auswertungen ergaben:

a) für die mit *Schweineserumlipoid* behandelte Portion:

Dosis des ip. injizierten Filtrates	Ergebnis der intravenösen Reinjektion mit 0,2 ccm Schweineserum
5,0 ccm (= 0,5 ccm Serum Z_{26})	+ 3 Min.
2,5 „ (= 0,25 „ „)	+ 3 „
1,0 „ (= 0,1 „ „)	θ

b) für die mit *Pferdeserumlipoid* behandelte Portion (Kontrolle):

5,0 ccm (= 0,5 ccm Serum Z_{26})	+ 3 Min.
2,5 „ (= 0,25 „ „)	+ 4 „
1,0 „ (= 0,1 „ „)	schwerer Schock, erholt sich rasch und überlebt

Eine minimale Abschwächung des Antikörpers war also durch die Adsorption mit Schweineserumlipoid scheinbar erfolgt, eine Abschwächung, die durch das Pferdeserumlipoid nicht zu erzielen war. *Wir möchten indes auf diesen Befund kein großes Gewicht legen.* Wie aus den im 1. Versuch angegebenen Daten erhellt, wurden 0,5 ccm Serum Z_{26} schon *durch 0,0005 ccm Schweineserum* vollständig neutralisiert, während die aus *1,0 ccm Schweineserum* gewonnenen (durch Alkohol extrahierbaren) Lipoide keine nachweisbare Reduktion der passiv präparierenden Kraft bewirkten. Zudem können wir nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen, daß unsere „Lipoidextrakte“ noch Spuren von koaguliertem, aber bindungsfähigem Eiweiß (in Form kleinster, die Papierfilter passierender Partikelchen) enthielten; die konstatierte Abschwächung (die ganz außerhalb der rechnungsgemäß zu erwartenden Grenzen lag) könnte daher auch auf solche „albuminoide Verunreinigungen“ der hergestellten Lipoidpräparate bezogen werden. Gerade der Umstand, daß trotz der angewendeten enormen Lipoidüberschüsse keine vollständigere Neutralisierung des anaphylaktischen Antikörpers möglich war, bestärkt uns in der Annahme solcher Fehlerquellen und wir erblicken daher in den hier wiedergegebenen Versuchsresultaten eine zureichende Bestätigung der alten Auffassung, *daß der Serumanaphylaxie wirklich eine Eiweiß-Antieiweiß-Reaktion zugrunde liegt.*

Wenn man also ein Meerschweinchen mit einem artfremden Serum aktiv präpariert, so wird es nach Ablauf einer gewissen Frist (Inkubationsperiode der aktiven Anaphylaxie) gegen das in diesem Serum enthaltene spezifische Eiweiß überempfindlich. Gegen diese Aussage, die seit *Richet* von allen Autoren ohne Ausnahme wiederholt wurde, scheint kein prinzipieller Einwand möglich, da sie ja lediglich den Zweck verfolgt, das Ergebnis eines konstant reproduzierbaren Experimentes unpräjudizierlich zu beschreiben. Ist es aber nicht an sich höchst wider-

spruchsvoll, daß sich eine „Überempfindlichkeit“ passiv durch Serum (d. h. durch unbelebte Materie) auf normale Individuen übertragen läßt? Unter Empfindlichkeit versteht man in der Biologie jene Eigenschaft lebender Zellen, welche sie befähigt, auf *Reize* d. h. auf Änderungen der Lebensbedingungen mit einer Änderung ihrer Lebensfunktionen zu reagieren. Die Reizémpfindlichkeit wird in der Physiologie ganz allgemein als eines der wichtigsten Kriterien der *lebenden* Substanz betrachtet; ihre Abspaltung vom lebenden Gewebe in Form eines *unbelebten* Stoffes bedeutet daher — nicht nur für den Vitalisten — auf den ersten Blick eine Absurdität. Das gilt selbstverständlich auch für die pathologischen Abweichungen der normalen Reizempfindlichkeit, für die Hypo- und die uns hier interessierende Hypersensibilität. Der paradoxe Charakter des passiv anaphylaktischen Versuches erfährt aber noch eine weitere Steigerung, wenn man folgende Überlegung anstellt: Der passive Transport der Hypersensibilität wird durch einen Antikörper bewerkstelligt, der in vitro und in vivo die schädigende Substanz d. h. jenen Stoff, gegen welchen das Tier überempfindlich ist, neutralisiert. Um diese Widersprüche zu lösen, wollen wir die passiv anaphylaktische Versuchsanordnung, wie sie in der ersten und in der zweiten Versuchsserie angewendet wurde, genauer betrachten; sie läßt sich in folgende Phasen zergliedern:

1. *intraperitoneale Vorbehandlung* mit dem passiv präparierenden Immunserum;
2. Einschaltung eines *48stündigen Intervalles;*
3. *intravenöse Reinjektion* des spezifischen Antigens.

ad 1. Das passiv präparierende Immunserum muß nicht intraperitoneal einverleibt werden; man kann dasselbe, ohne am Effekt etwas zu ändern, auch *subcutan*, *intramuskulär* oder *intravenös* einspritzen.

Versuch 3.

Eine Reihe von Meerschweinchen wird mit fallenden Mengen des Immunserums Z_{26} in die rechte Jugularvene injiziert; *nach 10 Stunden* erfolgt die Reinjektion von 0,2 ccm Schweineserum in die linke Jugularis.

Dosis des intravenös injizierten, passiv präparierenden Serums Z_{26}	Ergebnis der intravenösen Reinjektion von 0,2 ccm Schweineserum
1,0 ccm	+ 3 Min.
0.5 „	+ 4 „
0.25 „	+ 7 „
0.1 „	schwere Symptome, erholt sich und überlebt
0.05 „	mäßig schwere, protr. S.; überlebt.

ad 3. Hingegen bleibt der akut letale Schock aus, wenn man die Reinjektion des spezifischen Antigens nicht intravenös, sondern subcutan oder intraperitoneal ausführt und zwar auch dann, wenn man die Antigendosis sehr beträchtlich steigert. Nach intraperitonealer Reinjek-

tion großer Antigenquanten beobachtet man höchstens die Zeichen eines *protrahierten* Schocks, der erst in 1—2 Stunden tödlich endet; man darf annehmen, daß aus der mit Antigen überschwemmten Bauchhöhle ein Übertritt kleiner Antigenmengen ins Blut stattfindet, da man ein ganz identisches Symptomenbild auch erzeugen kann, wenn man subletale bzw. nicht mehr akut tötende Dosen direkt in die Zirkulation bringt. Für das Zustandekommen *eines akut letalen Schocks* scheint somit *der Erfüllungsort der Reaktion* zwischen Antigen und Antikörper maßgebend zu sein; er muß in die Blutbahn verlegt werden, wenn man den durch seine Intensität und seinen rapiden Ablauf imponierenden Maximaleffekt erziehen will. Ob sich die Eiweiß-Antieiweiß-Reaktion *im Blutstrom selbst* oder *in den anrainenden Zellen, den Gefäßendothelien,* abspielt, läßt sich natürlich zunächst nicht entscheiden.

ad 2. Die Notwendigkeit des Ablaufes der Antigen-Antikörper-Reaktion in der Blutbahn macht es verständlich, daß *nach der intraperitonealen passiven Präparierung* der Meerschweinchen ein gewisser Zeitraum verstreichen muß, bevor sich ein akut letaler Schock provozieren läßt; die Einhaltung einer bestimmten Frist könnte einfach dadurch bedingt sein, daß die Resorption hinreichender Antikörpermengen ins Blut längere Zeit beansprucht. Es besteht aber — wie bereits betont — die Möglichkeit, das passiv präparierende Immunserum direkt in die Gefäße einzuspritzen; wird durch den Antikörper tatsächlich „die Überempfindlichkeit" übertragen, so sollte man erwarten, daß nunmehr die Einschaltung eines Zeitintervalles überflüssig wird. Das ist aber, wie schon *Doerr* und *Russ* gezeigt haben, nicht der Fall. Aus verschiedenen, später zu erörternden Gründen haben wir derartige Versuche wiederholt.

Versuch 4.

4 Meerschweinchen wurden mit fallenden Dosen Schweineserum in die rechte Jugularvene injiziert; nach 3 Minuten wurde in die linke Jugularis 0,5 ccm Immunserum von Kaninchen Z_{26} eingespritzt.

0,2 ccm Schweineserum iv., nach 5 Min. 0,5 ccm Serum Z_{26} . . . . θ
0,1 „ „ „ „ 5 „ 0,5 „ „ . . . . θ
0,05 „ „ „ „ 5 „ 0,5 „ „ . . . . θ
0,02 „ „ „ „ 5 „ 0,5 „ „ . . . . θ

Es blieb also jeder Erfolg aus, obwohl die Dosen der beiden Reaktionskomponenten bei sämtlichen Tieren so bemessen wurden, daß sie in der gewöhnlichen Versuchsanordnung (vgl. Versuch 1) zum Exitus innerhalb weniger Minuten geführt hätten. *Verändert war hier die Reihenfolge der Zufuhr, indem der Antikörper dem Antigen nachgeschickt wurde.* Wie zahlreiche Untersuchungen (*Doerr* und *R. Pick* u. a.) lehren, konnte das Antigen innerhalb von 3 Minuten nicht aus der Blutbahn verschwunden sein; es kam nicht einmal eine erhebliche Reduktion desselben in Frage, um so weniger als z. B. das erste Tier der

Reihe das 10fache Multiplum der erforderlichen Antigenmenge (0,2 ccm Schweineserum) erhalten hatte. Andererseits mußte eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden haben; als wir nämlich die Tiere nach weiteren 48 Stunden einer Probe auf eine bestehende Überempfindlichkeit durch intracarotale Injektion von 0,2 ccm Schweineserum unterzogen, reagierte keines anaphylaktisch; der passiv präparierende Antikörper war also durch das vorgespritzte Antigen abgesättigt worden. Das Ergebnis solcher Versuche läßt gar keine andere Erklärung zu, als *daß auch eine in der Zirkulation ablaufende Eiweiß-Antieiweiß-Reaktion noch nicht genügt, um das Schockphänomen hervorzurufen.* Zu dem gleichen Schlusse gelangt man, wenn man zwar die übliche Reihenfolge Antikörper-Antigen beibehält, aber das Intervall zwischen der intravenösen Zufuhr der beiden Reaktionskomponenten stark verkürzt.

Versuch 5.

4 Meerschweinchen erhalten intravenöse Injektionen fallender Dosen Serum Z_{26}; nach 5 Minuten wird bei jedem Tiere 0,2 ccm Schweineserum in die andere Jugularvene eingespritzt:

1,0 ccm Serum Z_{26} iv.,	nach 5 Min. 0,2 ccm Schweineserum iv.	θ
0,5 „ „ „	„ 5 „ 0,2 „ „ „	θ
0,25 „ „ „	„ 5 „ 0,2 „ „ „	θ
0,1 „ „ „	„ 5 „ 0,2 „ „ „	θ

Erst wenn man nach der intravenösen Einverleibung des passiv präparierenden Antiserums längere Zeiten verstreichen läßt, stellt sich als Reinjektionsfolge das Schocksyndrom ein; nach Ablauf von 7—10 Stunden werden die Ausschläge maximal (vgl. Versuch 3) d. h. es genügen dann die kleinsten Mengen Antiserum, um gegen eine konstante Dosis Antigen tödlich zu sensibilisieren, oder man kann umgekehrt bei konstanter Präparierung mit den kleinsten Antigenmengen den akut letalen Schock auslösen. Diese Erscheinung hat man als die *Latenzperiode der passiven Anaphylaxie* bezeichnet (*Otto*, *Doerr* und *Russ*); sie hat zu breiten Diskussionen Veranlassung gegeben, die auch heute noch nicht als beendet betrachtet werden können. Von allem Anfang an war man zu der Annahme geneigt, *daß der Antikörper bzw. das antikörperhaltige Immunserum im Blute des Meerschweinchens eine Veränderung erleiden müsse,* welche die notwendige Voraussetzung der als Schock bezeichneten pathogenen Auswirkung seiner Reaktion mit dem Antigen darstellt. Über die Art dieser Veränderungen gingen die Ansichten weit auseinander. Man dachte zuerst daran, daß der Antikörper selbst irgendwie transformiert („aktiviert") wird; da es aber auf keine Weise gelingen wollte, diese supponierte Aktivierung ohne Zuhilfenahme des Organismus zu bewerkstelligen und die Latenzperiode der passiven Anaphylaxie zum Verschwinden zu bringen, ging man von dieser Idee wieder ab, die schon a priori unhaltbar war, weil ja das passiv

präparierende Immunserum im natürlichen („nichtaktivierten“) Zustande in vitro mit dem korrespondierenden Antigen ohne weiteres unter gegenseitiger Absättigung reagiert (vgl. Versuch I). Es ist nicht einzusehen, warum der von Haus aus aktive d. h. reaktionsfähige Antikörper noch einer besonderen humoralen Aktivierung bedürfen sollte; seine Affinität zum Antigen ist bereits außerhalb des Organismus im Reagensglase im vollen Ausmaße nachweisbar und auf dieser Affinität beruht — darüber kann kein Zweifel herrschen — die Auslösung der anaphylaktischen Symptome. Eine andere Hypothese, die sogenannte *celluläre Theorie der Anaphylaxie*, betrachtet die Latenzperiode der passiven Versuchsanordnung als jenen Zeitraum, der notwendig ist, *damit sich der intravenös einverleibte Antikörper an bestimmte Zellen (die Gefäßendothelien) verankert.* Nach dieser von *R. Weil*, *Dale*, *Coca*, *Doerr* u. a. vertretenen Auffassung wird die Eiweiß-Antieiweißreaktion nur dann pathogen, wenn sie an oder in lebenden fixen Gewebselementen abläuft, und diese Forderung ist offenbar bloß auf dem Wege realisierbar, daß eine der beiden Reaktionskomponenten bereits *„zellständig“* ist, wenn die andere von außen zugeführt wird; bei der aktiven und passiven Anaphylaxie soll der Antikörper, bei der inversen das Antigen in der als unerläßlich betrachteten Art lokalisiert, an Zellen (in erster Linie an Endothelien) gebunden sein. Die celluläre Theorie der Anaphylaxie erklärt nicht nur die Latenzperiode der passiven Versuchsanordnung in plausibler Weise, sie beseitigt auch das Paradoxon, daß eine Substanz bloß deshalb schädigend wirken soll, weil in dem betreffenden Organismus ein diese Substanz *neutralisierender* Stoff (ein Antikörper) vorhanden ist; sie reduziert den Mechanismus der anaphylaktischen Funktionsstörungen auf *das uns wohlbekannte Schema jener cytotoxischen Erscheinungen, die man stets beobachten kann, wenn eine lebende Zelle mit einem gegen ihre Proteine oder Lipoide gerichteten Antikörper in Kontakt gebracht wird*, ein Schema, das eben nichts anderes darstellt als die *„inverse Anaphylaxie“ einzelliger Elementarorganismen* (*Doerr*). Die celluläre Theorie besitzt aber noch einen anderen, erkenntniskritisch außerordentlich wichtigen Vorzug. In letzter Zeit wurde namentlich von *Friedberger* behauptet, daß die Latenzperiode des passiv anaphylaktischen Experimentes die wesentlichste Stütze der cellulären Theorie sei und daß diese Theorie fallen müsse, wenn für die Latenzperiode eine andere Erklärung gefunden werden könnte. Jeder, der mit dem gegenwärtigen Stande der Allergie- und Anaphylaxieforschung auch nur einigermaßen vertraut ist, weiß, daß diese Aussage in keiner Beziehung den Tatsachen entspricht und scharf zurückgewiesen werden muß. Die celluläre Theorie baut sich derzeit auf eine stattliche Reihe von Beobachtungen und experimentellen Ergebnissen auf, die voneinander und vom passiv anaphylaktischen Versuch unabhängig sind

und sich sämtlich in gleichem Sinne verwerten lassen; diese Sachlage erfordert geradezu den Versuch, auch das passiv anaphylaktische Phänomen in diese allgemeine Übereinstimmung einzuordnen. Zudem würde jede andersgeartete Erklärung der passiven Latenzperiode nur dann erkenntnistheoretischen Wert beanspruchen dürfen, wenn sie uns nicht zu dem paradoxen Ausgangspunkt der Betrachtung zurückleitet: zur passiven Übertragung einer „*Überempfindlichkeit*“ durch einen die reizende Noxe neutralisierenden Antikörper.

Friedberger hat nun (in Gemeinschaft mit *Hjelt*) folgende Vorstellungen entwickelt: Das passiv anaphylaktische Experiment wird seit *Doerr* und *Russ* so gut wie ausschließlich in der *heterologen* Anordnung ausgeführt d. h. es wird das passiv präparierende Immunserum von *Kaninchen* gewonnen und zwecks Erzeugung des anaphylaktischen Zustandes *Meerschweinchen* eingespritzt. Im Kaninchenimmunserum ist aber nicht nur Antikörper, sondern auch ein für das Meerschweinchen artfremdes Eiweiß enthalten; das mit dem Antikörper einverleibte Protein wirkt temporär hemmend (auslöschend) auf das Zustandekommen einer anaphylaktischen Reaktion; der Schock läßt sich daher erst dann wieder auslösen, wenn diese Hemmung partiell oder total abgeklungen ist. Über das Wesen dieser Hemmung Betrachtungen anzustellen, hält *Friedberger* für ein „müßiges“ Unternehmen; er meint jedoch, daß es sich um einen „rein humoralen Vorgang“ handeln dürfte, um einen Prozeß, der sich im zirkulierenden Blute abspielt und an dem sich fixe Gewebselemente nicht beteiligen. Als Beweise für diese Ansichten werden angeführt:

1. Die passive Anaphylaxie kann ausgelöscht werden, wenn man vor der Reinjektion des Antigens *normales Kaninchenserum* intravenös einspritzt.

2. Ebenso wie die passive ist auch die aktive Anaphylaxie durch intravenöse Injektion von Normalserum, speziell von Normal-Kaninchenserum auslöschbar.

3. Bei **homologer** passiver Sensibilisierung (Präparierung mit hochwertigen Meerschweinchen-Immunserum) kann die Latenzperiode zum Verschwinden gebracht werden.

Diese an sich recht überzeugend klingenden Angaben hat indes *Friedberger* selbst in zahlreichen und sehr interessanten Beziehungen ganz erheblich eingeschränkt, und es war gerade dieser Umstand, der uns bewog, die Befunde nachzuprüfen und (zum Teil unter Variierung einzelner Versuchsbedingungen) den Sachverhalt klarzustellen.

Um möglichst wenig komplizierte Verhältnisse zu schaffen, wurde vorerst untersucht, ob ein antagonistischer Einfluß von Normal-Kaninchenserum *auf die inverse Anaphylaxie des Meerschweinchens* nachzuweisen ist, eine Frage, die von *Friedberger* und *Hjelt* nicht berücksich-

tigt wurde, die aber in dem uns hier beschäftigenden Zusammenhang Beachtung verdient; bei der inversen Anaphylaxie kann ja eine zellständige (nichthumorale) Antigen-Antikörperreaktion als Ursache der beobachteten, in jeder Hinsicht typischen Schocksymptome nicht in Abrede gestellt werden.

Versuch 6.

Kaninchen Z_{21} wurde mit wässerigem Pferdenierenextrakt immunisiert. Das Serum des Kaninchens wirkte auf Meerschweinchen von 250 g Körpergewicht in folgender Weise „toxisch“ (*intravenöse Injektion*):

0,4 ccm iv.	+ 3 Min.
0,35 „ „	+ 5 „
0,3 „ „	+ 10 „ , Lungenödem.
0,2 „ „	protr. S., Somnolenz, erholt sich und überlebt
0,1 „ „	leichteste Symptome, überlebt

Nun wurden 2 normale Meerschweinchen in die rechte Jugularis mit *2,0 ccm Normalkaninchenserum* injiziert; nach 5 bzw. 8 Min. erhielten die Tiere in die linke Jugularvene 0,35 bzw. 0,4 ccm Serum Z_{21}, also *wenig mehr als die nach der obigen Auswertung minimal tödliche Dosis*:

2,0 ccm Normal-Kaninchenserum iv., nach 5 Min. 0,4 ccm Serum Z_{21} iv.	+ 5 Min.
2,0 ccm Normal-Kaninchenserum iv., nach 8 Min. 0,35 ccm Serum Z_{21} iv.	+ 7 „ , Ödem.

Der invers anaphylaktische Schock wird — wie man sieht — *selbst durch sehr große Dosen Normal-Kaninchenserum nicht gehemmt.* Auf das Zustandekommen und den Ablauf der Schocksymptome hat also „artfremdes Serum“ keinen Einfluß; wenn eine antagonistische Wirkung bei der aktiven und bei der passiven Anaphylaxie de facto zu konstatieren ist, so müßte sie eine andere Ursache haben.

Faßt man die Experimente von *Friedberger* und *Hjelt* über die Auslöschung der **aktiven** Anaphylaxie durch artfremdes Serum ins Auge, so fällt es sofort auf, daß bei Meerschweinchen, die mit *Hammelserum* präpariert wurden, nur *Kaninchenserum*, nicht aber *Serum vom Pferde, Huhne, Meerschweinchen oder vom Menschen* antagonistisch wirkte. Es ist wohl ohne weiteres klar, daß der beobachtete hemmende Effekt nicht auf der „Artfremdheit“ des Kanincheneiweißes beruhen konnte; artfremd sind für das Meerschweinchen ja auch die Proteine des Pferde-, Hühner- oder Menschenserums. Vielmehr mußte der Grund der Erscheinung in besondere Beziehungen verlegt werden, die zwischen Hammel- und Kanincheneiweiß bestehen; es ist nicht zu verstehen, daß *Friedberger* aus seinen Resultaten gerade den umgekehrten Schluß abgeleitet und die Angelegenheit nicht weiter verfolgt hat. Da *Friedberger* und *Hjelt* auch die aktive Anaphylaxie gegen *Pferdeserum* durch *Normal-Kaninchenserum* derart abzuschwä-

chen vermochten, daß die Tiere die 10fache Reinjektionsdosis des Antigens vertrugen, haben wir diese Kombination für eine eingehendere Analyse gewählt.

Versuch 7.

24 Meerschweinchen von 250 g Körpergewicht wurden am 9. X. 1925 mit 0,1 ccm Pferdeserum subcutan sensibilisiert. Am 2. XI. (nach 24 Tagen) wurde die minimale tödliche Reinjektionsdosis Pferdeserum ausgewertet; sie betrug 0,1 ccm intravenös.

0,2 ccm Pferdeserum iv.	+ 7 Min.
0,1 „ „ „	+ 4 „
0,1 „ „ „	+ 10 „
0,05 „ „ „	schwerste Dyspnöe, Somnolenz, fällt um, erholt sich und überlebt

Die Injektion eines Gemisches von 1,0 ccm Normal-Kaninchenserum + 0,1 ccm Pferdeserum wirkte genau so, wie wenn das Pferdeserum allein eingespritzt worden wäre:

1,0 ccm Normal-Kaninchenserum + 0,1 ccm Pferdeserum iv. . . . . . + 5 Min.

Dieses negative Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von *Friedberger* und *Hjelt* überein; auch diese Autoren konnten keine Auslöschwirkung erzielen, wenn sie das auslöschende Serum und das Antigen gleichzeitig in eine Vene spritzten. Wohl aber genügte die Einschaltung eines sehr kleinen Zeitintervalles, um den hemmenden Effekt des vorinjizierten Normal-Kaninchenserums in Erscheinung treten zu lassen. Wir wählten dementsprechend Pausen von genau 1, 6, 8, 10 Minuten und von 6 Stunden. Als Reinjektionsdosis des Antigens wurden 0,12 bis 2 ccm Pferdeserum benutzt, also nicht mehr als das Doppelte der tödlichen Minimaldosis, um auch geringere Grade der hemmenden Wirkung beobachten zu können. Das hemmende Normal-Kaninchenserum spritzten wir dagegen in Quantitäten von 0,5—2,0 ccm d. h. in sehr großen Dosen ein:

0,5 ccm N.-Kan.-Ser. iv., nach	1 Min.	0,2 ccm Pferdeserum iv.	+ 3 Min.
0,5 ccm N.-Kan.-Ser. iv., nach	1 „	0,2 ccm Pferdeserum iv.	+ 3 Min.
0,5 „ „ „ „	1 „	0,12 „ „ „	+ 4 Min.
1,0 „ „ „ „	1 „	0,2 „ „ „	+ 5 Min.
2,0 „ „ „ „	1 „	0,2 „ „ „	+ 4 Min.
0,5 „ „ „ „	6 „	0,2 „ „ „	schwerste S., erholt sich und überlebt.
1,0 „ „ „ „	8 „	0,2 „ „ „	leichte S.
			leichte S. —
1,0 „ „ „ „	10 „	0,2 „ „ „	mittelschwere S. —
2,0 „ „ „ „	10 „	0,5 „ „ „	+ 12 Min.
1,5 „ „ „ „	6 Std.	0,2 „ „ „	+ 5 Min.

Die angebliche Auslöschwirkung war somit vorhanden, zwar nicht nach 1 Minute, wohl aber nach 6—10 Minuten; nach 6 Stunden war sie nicht mehr nachweisbar und selbst nach 6—10 Minuten waren die

Tiere nur gegen die doppelte Antigendosis und auch dann nur *partiell* geschützt, nicht aber gegen das fünffache Multiplum der Dosis letalis minima. Wie dieser schützende Effekt zustande kam, wurde uns sofort verständlich, *als wir das Verhalten der mit Pferdeserum aktiv sensibilisierten Meerschweinchen und normaler (nicht vorbehandelter Kontrollen) gegen das von uns verwendete Normal-Kaninchenserum prüften*:

normale Kontrolle:	2,4 ccm N.-Kan.-Serum iv.	θ
„ „ :	2,0 „ „ „	θ
mit 0,1 ccm Pferdeserum subcutan sensibilisierte Meerschweinchen:	2,4 „ „ „	+ 5 Min.
	2,0 „ „ „	+ 3 Min.
	2,0 „ „ „	schwere S., fällt um, erholt sich und überlebt.
	1,5 „ „ „	deutliche S. —

Die mit *Pferdeserum* vorbehandelten Meerschweinchen waren also auch gegen große Dosen **Kaninchenserum** überempfindlich, die *Spezifität* ihrer aktiven Anaphylaxie war nur eine *relative*, eine Erscheinung, die bereits *Doerr* und *Russ* (Zeitschr. f. Immunitätsf. *3*, 195 ff., 1909) beschrieben hatten; die Schutzwirkung beruhte einfach auf einer **Antianaphylaxie**, die natürlich nicht in der Form einer kompletten Desensibilisierung (wie sie sich durch das homologe Antigen erzielen läßt) zum Ausdruck kam, sondern als eine transitorische Reaktionsunfähigkeit der für die anaphylaktische Noxe empfindlichen Gewebe (Gefäßendothelien).

Außer Normal-Kaninchenserum untersuchten wir noch:

a) *arteigenes (Meerschweinchen) Serum,*

b) *Normal-Schweineserum,* das bekanntlich zu den für das Meerschweinchen „primär toxischen" Serumarten gehört d. h. zu jenen, welche intravenös injiziert bei normalen Tieren einen u. U. tödlichen Schock hervorrufen, und

c) ein gleichfalls primärtoxisches *Immunserum von Kaninchen Y 22, gewonnen durch Immunisierung mit Pferdenierenextrakt,* das den als „inverse Anaphylaxie" bekannten Schock auszulösen vermochte.

Es war zu erwarten, daß das Normal-Meerschweinchenserum keine „Auslöschwirkung" geben würde, daß dagegen das Normal-Schweineserum und das Anti-Pferdenierenserum vom Kaninchen den Schock abpuffern sollten, da es bekannt ist, daß alle Arten des Schocks einen gewissen, wenn auch nur geringgradigen und vorübergehenden Schutz gegen die Folgen eines spezifisch anaphylaktischen Prozesses verleihen (sog. unspezifische Antianaphylaxie). Das Resultat stimmte mit dieser Erwartung überein, wie die nachstehende Tabelle lehrt:

2,4 ccm N.-Meerschw.-Ser. iv., nach 8 Min. 0,1 ccm Pferdes. iv. + 4 Min.
2,0 „ N.-Schweine-Ser. „, „ 12 „ 0,1 „ „ „ protr. S., Exitus erst in 45 Min. —
1,0 „ „ „, „ 10 „ 0,1 „ „ „ protr. S., erholt sich und überlebt.
0,12 „ Serum Y_{22}-Serum „, „ 14 „ 0,2 „ „ „ somnolent, erholt sich bald.
0,1 „ „ „, „ 12 „ 0,2 „ „ „ Schock, erholt sich langsam u. überlebt.
0,08 „ „ „, „ 12 „ 0,2 „ „ „ + 4 Min.

Hierzu kommen als **Kontrollen** *folgende nicht vorbehandelte (normale) Meerschweinchen:*

2,4 ccm Schweineserum iv. . . . . + 12 Min., Lungenödem. —
2,4 „ „ „ . . . . schwerste S., erholt sich nur langsam.
1,0 „ „ „ . . . . Schock, erholt sich rasch und überlebt.
0,12 „ Serum Y_{22} . . . . schwerer Schock, erholt sich.
0,1 „ „ . . . . mittelschwere S.
0,08 „ „ . . . . θ

Es sei besonders darauf aufmerksam gemacht, in wie geringen Mengen das Immunserum von Kaninchen Y 22 (Pferdenierenantiserum) im Vergleich zu Normal-Kaninchenserum hemmend wirkte und wie die hemmende Wirkung hier ganz von der Dosis bzw. von der Intensität des invers anaphylaktischen Schocks abhing.

Das Gesamresultat dieser Versuchsreihe kann somit in folgender Weise formuliert werden:

1. Schaltet man in der aktiv anaphylaktischen Versuchsanordnung vor die intravenöse Reinjektion des schockauslösenden Antigens eine ebenfalls intravenöse Injektion irgendeines heterologen (d. h. dieses Antigen nicht enthaltenden) Normal- oder Immunserums ein, so wird der spezifisch anaphylaktische Schock mehr oder weniger stark abgedämpft, wenn das vorgeschaltete Normal- oder Immunserum (sei es infolge seiner primären Toxizität, sei es infolge seiner Verwandtschaft mit dem verwendeten Antigen) selbst auf die Schockgewebe einwirkt und die Reaktivität derselben herabsetzt. Es handelt sich daher hier nicht um eine „auslöschende Wirkung artfremder Proteine" (*Friedberger* und *Hjelt*), sondern um Spezialfälle der unspezifischen Antianaphylaxie.

2. Der antagonistische Effekt tritt dementsprechend nicht ein, wenn man das schockauslösende Antigen und das „hemmende" Normal- oder Immunserum miteinander gemischt oder zwar getrennt, aber in ganz kurzem Zeitintervall (innerhalb 1 Minute) in die Zirkulation bringt, da sich dann die beiden Schockwirkungen superponieren bzw. summieren. Vielmehr muß der durch das vorgeschaltete Serum gesetzte Schock bereits im Gange bzw. zum Teile abgelaufen sein (was nach einigen Minuten der Fall ist), damit die verminderte Beanspruchbarkeit (Ermüdung?) des Schockgewebes zum Ausdrucke gelangt.

3. Die Abpufferung des spezifisch anaphylaktischen Schocks war in den geprüften Kombinationen nur geringgradig und rasch vorübergehend. Sie ließ sich durch Erhöhung der Reinjektionsdosis des schockauslösenden Antigens wieder völlig kompensieren und war schon nach 6 Stunden gänzlich verschwunden.

4. Immunsera vom Kaninchen, die eine hohe primäre Toxizität besaßen, wirkten bei mit Pferdeserum aktiv präparierten Meerschweinchen schon in 10fach kleinerer Dosis hemmend als Normal-Kaninchenserum. Auch diese Beobachtung beweist, daß die Hemmungswirkung nicht dem „artfremden" Kanincheneiweiß, sondern nur den schockauslösenden Effekten der betreffenden Sera zugeschrieben werden kann, die beim Serum Y 22 an wesentlich kleinere Dosen (0,1 ccm) gebunden war als beim Normal-Kaninchenserum (1,5—2,0 ccm).

Wie verhält sich aber die angeblich „auslöschende" Wirkung des Normal-Kaninchenserums im **passiv** *anaphylaktischen Versuch*? Um diese Frage zu beantworten, prüften wir eine von *Friedberger* und *Hjelt* nicht untersuchte Kombination. Wir sensibilisierten Meerschweinchen passiv heterolog mit einem *Anti-Schweineserum* (vom Kaninchen B 28) um die Ergebnisse mit den Resultaten unserer eigenen Experimente (vgl. Versuch 1—6) vergleichen zu können, die sich ja sämtlich auf die passive Anaphylaxie gegen Schweineserum-Eiweiß bezogen.

Versuch 8.

Das Immunserum B_{28}, gewonnen durch parenterale Behandlung eines Kaninchens mit Schweineserum, besaß folgendes passives Präparierungsvermögen:

1,0 ccm	Ser. B 28 ip.,	nach 48 Std.	0,2	Schweineserum	iv.	+ 3 Min.
0,5 „	Ser. B 28 „,	„ 48 „	0,2	„	„	+ 4 „
0,5 „	Ser. B 28 „,	„ 48 „	0,2	„	„	+ 5 „
0,25 „	Ser. B 28 „,	„ 48 „	0,2	„	„	schwerste Symptome, überlebt.
0,1 „	Ser. B 28 „,	„ 48 Std.	0,2	„	„	mäßig schwere Symptome, überlebt.

0,5 ccm Serum B 28 intraperitoneal reichten somit gerade hin, um eine derartige passive Hypersensibilität zu erzeugen, daß die intravenöse Injektion von 0,2 ccm Schweineserum nach 48 Stunden akuten Schocktod hervorrief. Es wurden daher weitere Meerschweinchen mit je 0,5 ccm Serum B 28 intraperitoneal präpariert und nach 48 Stunden intravenös reinjiziert:

a) mit Gemischen von 0,2 ccm Schweineserum und großen Dosen Normal-Kaninchenserum; die Gemische wirkten, als ob in denselben nur Schweineserum enthalten gewesen wäre:

0,2 ccm Schweineserum	+ 1,0 ccm Normal-Kaninchenserum	+ 5 Min.
0,2 „ „	+ 2.0 „ „	+ 5 „

b) in die rechte Jugularis mit großen Dosen Normal-Kaninchenserum und nach 1—10 Min. in die andere (linke) Jugularvene mit 0,2 ccm Schweineserum:

1,0 ccm Normal-Kaninchenserum iv.,	nach 1 Min.	0,2 ccm	Schweineserum	+ 5 Min.
1,0 „ „ „	„ 5 „	0,2 „	„	+ 5 „
1,0 „ „ „	„ 10 „	0,2 „	„	+ 5 „
2,0 „ „ „	„ 5 „	0,2 „	„	+ 5 „

Eine hemmende Wirkung war somit weder in dem einen noch im anderen Falle feststellbar; *das Ergebnis war absolut negativ.* Allerdings geben *Friedberger* und *Hjelt* an, daß das sog. „Auslöschphänomen“ bei der passiven Anaphylaxie erst nach 1 Stunde voll ausgebildet sei und mindestens 24 Stunden anhalte. Wir sahen aber keine Veranlassung, diese Intervalle zu prüfen, da sie mit der Latenzperiode der heterologen passiven Anaphylaxie in keine wie immer geartete Beziehung gebracht werden können. Diese Latenzperiode beginnt ja bekanntlich mit dem Augenblick der intravenösen Injektion des passiv präparierenden Kaninchen-Immunserums; schon nach 1 Stunde lassen sich deutliche Symptome auslösen, nach 4 Stunden akuter Schocktod und nach 7 bis 10 Stunden ist die Präparierung optimal d. h. die Hypersensibilität erfährt keine weitere Steigerung (*Doerr* und *Russ*; vgl. ferner die Versuche 2, 3 und 4 der vorliegenden Arbeit). Obwohl *Friedberger* diese Tatsachen aus der älteren Fachliteratur vertraut sein mußten, findet sich in der zitierten Publikation kein Hinweis darauf; vielmehr liest man in den Schlußfolgerungen den Satz: „Das Auslöschphänomen vermag das Inkubationsstadium bei der passiven Anaphylaxie der mit Antiserum vom Kaninchen präparierten Meerschweinchen ohne die Hypothese eines Zellständigwerdens des Antiserums zu deuten.“ *Nach den hier mitgeteilten Versuchen kann jedoch davon keine Rede sein,* denn es wurde gezeigt:

1. Daß die heterologe passive Anaphylaxie gegen Schweineserum auch durch sehr große Dosen Normal-Kaninchenserum (1—2 ccm) nicht nur nicht ausgelöscht, sondern nicht einmal merklich abgeschwächt wird. Zur passiven Präparierung benötigt man überdies weit kleinere Mengen Kaninchenimmunserum; wir hatten Sera in Händen, von denen 0,1 resp. 0,05 ccm zur Erzeugung eines maximalen anaphylaktischen Zustandes vollkommen ausreichten; die Latenzperiode war jedoch nach so kleinen Präparierungsdosen nicht kürzer, sondern länger als nach großen Dosen des gleichen Immunserums, was mit der Annahme, daß das artfremde Kanincheneiweiß „auslöschend“ wirkt, gleichfalls nicht in Einklang gebracht werden kann (vgl. hierzu auch Versuch 3 und Versuch 5).

2. Auch bei der aktiven Anaphylaxie gibt es kein „Auslöschphänomen“ im Sinne von *Friedberger.* Wenn man durch Vorschaltung einer intravenösen Injektion von Normal-Kaninchenserum die Folgen der darauffolgenden intravenösen Injektion des spezifischen Antigens abschwächen kann, so ist diese Erscheinung an bestimmte Voraussetzungen gebunden und als unspezifische Antianaphylaxie aufzufassen. Zudem kommt das Phänomen gar nicht zustande, wenn man Gemische von Normal-Kaninchenserum und Antigen intravenös injiziert oder wenn man ein Intervall von einer Minute zwischen Normal-Kaninchenserum

und Antigen einschiebt; die Abpufferung des Schocks ist ferner selbst unter den für die beabsichtigte Wirkung günstigsten Bedingungen unvollkommen. Injiziert man dagegen einem normalen Meerschweinchen ein Gemisch von passiv präparierendem Kaninchenimmunserum und Antigen oder führt man das Antigen eine Minute nach dem Immunserum zu, so bleibt jedes Anzeichen einer schockartigen Reaktion vollständig aus.

3. Injiziert man zuerst das Antigen und dann das passiv präparierende Immunserum vom Kaninchen, so beobachtet man ebenfalls keinen anaphylaktischen Schock (Versuch 4), obwohl die gegenseitige Absättigung der beiden Reaktionskomponenten in der Blutbahn nachweislich stattfindet. Diese Unmöglichkeit der Umdrehung des passiv anaphylaktischen Experimentes spielt in dem Widerstreit zwischen den humoralen und den cellulären Theorien der Anaphylaxie zumindest eine ebensolche Rolle wie die Latenzperiode der passiven Versuchsanordnung. Sie kann a priori nicht darauf bezogen werden, daß das zuerst einverleibte Antigen als artfremdes Eiweiß hemmend (auslöschend) wirkt, da man mit der Antigendosis auf Zehntel, ja auf Hundertstel Kubikzentimeter artfremden Serums heruntergehen kann (nämlich auf jene Mengen, welche in der üblichen Reihenfolge akut letalen Schock erzeugen), ohne einen positiven Erfolg zu erreichen. Auch nützt es nichts, wenn man zwischen Antigen und Immunserum ein Intervall einschaltet, in welchem nach *Friedbergers* Angaben die Hemmungswirkung des artfremden Eiweißes längst abgeklungen sein müßte. Dagegen gelingt die Umdrehung ohne weiteres, wenn das Antigen von Haus aus zellständig, in den Gefäßendothelien lokalisiert ist (inverse Anaphylaxie). Diese Tatsachen müssen natürlich objektiv in Erwägung gezogen werden, wenn man den Mechanismus der passiven Anaphylaxie zu ermitteln sucht; *Friedberger* und *Hjelt* sind jedoch darauf nicht weiter eingegangen.

Die *Latenzperiode der* **heterologen** *passiven Anaphylaxie des Meerschweinchens* ist somit durch die Versuche von *Friedberger* und *Hjelt* in keiner Beziehung aufgeklärt worden. Nach wie vor bietet die celluläre Theorie, welche ein Zellständigwerden des Antikörpers in der Latenzperiode annimmt, die einzige Möglichkeit, zu einem Verständnis des Phänomens zu gelangen. Die Vorstellung von *Friedberger*, daß das artfremde Eiweiß als Träger des Antikörpers die Latenzperiode der heterologen passiven Anaphylaxie verschuldet, müssen wir als unbegründet ablehnen. *Friedberger* und *Hjelt* haben aber aus dieser Prämisse die Folgerung abgeleitet, daß die Latenzperiode verschwinden müßte, wenn man das artfremde Eiweiß ausschaltet, wenn man also die passive Versuchsanordnung nicht mit einem heterologen sondern mit einem **homologen** (vom Meerschweinchen gewonnenen) Immunserum ausführt. Allerdings

schienen die bisherigen Erfahrungen dieser Erwartung zu widersprechen; die Latenzperiode der passiven Anaphylaxie ist ja gerade im homologen Experiment von *Otto* festgestellt worden. *Friedberger* und *Seidenberg* teilten aber vor einiger Zeit mit, daß es ihnen nach jahrelangen Bemühungen und unter enormen Tierverlusten gelungen sei, durch eine anscheinend besonders günstige Art der Immunisierung hochwertige, passiv präparierende Meerschweinchenimmunsera herzustellen; wurde ein „solches artgleiches Antiserum einem Meerschweinchen in die Jugularvene und innerhalb 5 Minuten danach bei noch liegengebliebener Kanüle mit einer zweiten Spritze das homologe Antigen" injiziert, so trat ohne jedes Inkubationsstadium die typische Anaphylaxie mit allen Symptomen und dem charakteristischen Obduktionsbild" ein. Eine ausführliche Publikation der Versuche ist dieser vorläufigen Mitteilung, die keine weiteren Angaben als die eben zitierten enthält, bis jetzt nicht gefolgt, so daß es natürlich schwer fällt, die Experimente von *Friedberger* und *Seidenberg* zu beurteilen. Wir müssen uns daher vorbehalten, auf diesen Teil der Angelegenheit später zurückzukommen, und möchten nur an dieser Stelle über einige eigene Erfahrungen kurz berichten.

Auch uns ist es aufgefallen, daß man von Meerschweinchen nur selten Immunsera bekommt, welche noch in kleineren Mengen (1,0 ccm oder weniger) passiv präparieren. Es hängt das wohl damit zusammen, daß Meerschweinchen überhaupt freie Antikörper nur schwer und in geringer Wirkungsstärke (Konzentration) produzieren. Wenn Meerschweinchen im Gegensatze hierzu so leicht und regelmäßig aktiv anaphylaktisch gemacht werden können, so ist das eben nur ein Beweis dafür, daß zumindest für die aktive Anaphylaxie nicht der humorale, sondern der zellständige Antikörper maßgebend ist. Ganz in diesem Sinne sprechen ja auch die Versuche von *Fischer* über die Blutkörperchenanaphylaxie; *Fischer* konnte Meerschweinchen gegen die verschiedensten artfremden Erythrocyten maximal überempfindlich machen, vermochte aber nie, diese Hypersensibilität auch mit den größten Serummengen (4—5 ccm) passiv auf normale Meerschweinchen zu übertragen. Ab und zu bekamen wir aber von mit Pferdeserum immunisierten Meerschweinchen doch auch Sera, die sich für unsere Zwecke zu eignen schienen, indem sie bei intraperitonealer Einverleibung genügender Dosen eine passive Anaphylaxie gegen die intravenöse Reinjektion von 0,2 ccm Pferdeserum hervorriefen. Diese Sera wurden nun zunächst auf ihren Gehalt an anaphylaktischem Antikörper in der üblichen Weise austitriert, sodann wurden sie in den ermittelten Mengen in die eine Jugularvene injiziert; 5 Minuten später erfolgte die Injektion des Antigens (0,2 ccm Pferdeserum) in die Jugularis der anderen Körperseite.

Versuch 9.

Serum vom Meerschweinchen X_1:

	Dosis	Serum	Zeit	Antigen	Ergebnis
a)	1,0 ccm	Serum X_1 ip.,	nach 48 Std.	0,2 ccm Pferdeserum iv.	+ 3 Min.
	0,5 „	Serum X_1 „	„ 48 „	0,2 „ „ „	schwere protr. S., überlebt
	0,25 „	Serum X_1 „	„ 48 „	0,2 „ „ „	θ
	0,1 „	Serum X_1 „	„ 48 „	0,2 „ „ „	θ
b)	1,0 „	Serum X_1 **intravenös**,	„ 5 Min.	0,2 „ „ „	θ
	0,5 „	Serum X_1 „	„ 5 „	0,2 „ „ „	θ
	0,25 „	Serum X_1 „	„ 5 „	0,2 „ „ „	θ

Versuch 10.

Serum vom Meerschweinchen X_2:

	Dosis	Serum	Zeit	Antigen	Ergebnis
a)	0,5 ccm	Serum X_2 ip.,	nach 48 Std.	0,2 ccm Pferdeserum iv.	+ 3 Min.
	0,25 „	Serum X_2 „	„ 48 „	0,2 „ „ „	Dyspnöe, Krämpfe, erholt sich
b)	1,0 „	Serum X_2 iv.,	„ 5 Min.	0,2 „ „ „	θ
	0,5 „	Serum X_2 „	„ 5 „	0,2 „ „ „	θ
	0,25 „	Serum X_2 „	„ 5 „	0,2 „ „ „	θ

Versuch 11.

Serum vom Meerschweinchen X_4:

	Dosis	Serum	Zeit	Antigen	Ergebnis
a)	1,0 ccm	Serum X_4 ip.,	nach 48 Std.	0,2 ccm Pferdeserum iv.	+ 3 Min.
	0,5 „	Serum X_4 „	„ 24 „	0,2 „ „ „	+ 4 „
	0,25 „	Serum X_4 „	„ 24 „	0,2 „ „ „	+ 4 „
	0,1 „	Serum X_4 „	„ 24 „	0,2 „ „ „	leichte Symptome
b)	1,0 „	Serum X_4 „	„ 5 Min.	0,2 „ „ „	θ
	0,5 „	Serum X_4 „	„ 5 „	0,2 „ „ „	θ
	0,25 „	Serum X_4 „	„ 5 „	0,2 „ „ „	θ

Die Sera X_2 und X_4 waren jedenfalls als hochwertig zu bezeichnen; X_4 hatte einen Titer, welcher dem der meisten passiv präparierenden Immunsera vom Kaninchen (0,2 ccm) gleichkam. Nichtsdestoweniger waren wir **nicht** imstande, die Latenzperiode zum Verschwinden zu bringen. Worauf die Differenz gegenüber den Resultaten von *Friedberger* und *Seidenberg* zurückzuführen ist, vermögen wir einstweilen nicht zu entscheiden. Von der Versuchsanordnung der genannten Autoren sind wir — soweit sich das konstatieren läßt — nur insofern abgewichen, als wir das homologe Immunserum und das Antigen nicht in ein und dieselbe Vene, sondern *örtlich getrennt in die rechte bzw. linke Jugularis* einspritzten. Diese Technik schien einwandfreier, da sie den Einfluß etwaiger Blutgerinnungen in der liegengebliebenen Kanüle oder an den Außenwandungen derselben ausschaltet; im übrigen mußten ja auch bei dieser Methode die beiden Reaktionskomponenten den gleichen Weg durch den rechten Vorhof in den rechten Ventrikel und von da in die Pulmonalis nehmen. *Pferdeserum* wurde als Antigen

für diese Versuche gewählt, weil es für normale Meerschweinchen primär atoxisch ist; ebenso vermag auch Antipferdeserum (vom Kaninchen oder Meerschweinchen) in den verwendeten Mengen für sich allein keinen Schock hervorzurufen; selbstverständlich muß man sich in jedem Falle durch entsprechende Kontrollen nach beiden Richtungen hin sicherstellen, damit man nicht einen Effekt, der durch das Antiserum oder durch die Antigenlösung *allein* erzeugt wird, irrtümlicherweise auf eine *Reaktion zwischen Antikörper und Antigen* bezieht. Die Experimente über homologe passive Anaphylaxie werden derzeit fortgesetzt; über die Resultate werden wir ungesäumt berichten, mögen sie in diesem oder jenem Sinne ausfallen. Einstweilen können wir die Angaben von *Friedberger* und *Seidenberg* **nicht** bestätigen[1]).

Friedberger und *Seidenberg* schließen aus ihren Befunden, daß es ein Latenzstadium, welches mit dem Wesen der passiven Anaphylaxie zusammenhängt, überhaupt nicht gibt; die Inkubationsperiode, die man bisher beobachtet hat, sei ein rein akzidentelles Phänomen, welches nur bei einer bestimmten Versuchsanordnung (bei der passiven Präparierung mit artfremdem Immunserum) in Erscheinung tritt. Die zweite Hälfte dieser Behauptung ist sicher unrichtig; denn wir haben die Latenz (vgl. die Versuche 9, 10 und 11) auch bei der *homologen* passiven Präparierung unzweifelhaft festgestellt[1]) und außerdem gezeigt,

[1]) Während der Drucklegung dieser Arbeit gewannen wir noch ein weiteres *Meerschweinchen-Immunserum* (vom Meerschweinchen D_3), *welches ganz ungewöhnlich hochwertig war* und uns erlaubte, *unser Urteil über die Existenz und Notwendigkeit der Latenzperiode der* **homologen** *passiven Anaphylaxie des Meerschweinchens definitiv abzuschließen.* Die Auswertung des passiven Präparierungsvermögens wurde bei diesem Serum mit Hilfe intravenöser Vorbehandlung vorgenommen, da diese Methode sicherer ist als die intraperitoneale Zufuhr des sensibilisierenden Immunserums. Es ergab sich:

1,0	ccm Serum	D_3	iv., nach	24 Std.	0,2 ccm	Pferdeserum	iv.	+ 3 Min.	
0,5	„ „	D_3	„ „	24 „	0,2 „	„	„	+ 2 „	
0,4	„ „	D_3	„ „	24 „	0,2 „	„	„	+ 5 „	
0,2	„ „	D_3	„ „	24 „	0,2 „	„	„	+ 5 „	
0,1	„ „	D_3	„ „	24 „	0,2 „	„	„	Schock,	überlebt.
0,05	„ „	D_3	„ „	24 „	0,2 „	„	„	„	„

0,2 ccm Serum D_3 vermochten somit gegen die 24 Stunden später ausgeführte intravenöse Reinjektion von 0,2 ccm Pferdeserum tötlich zu präparieren und selbst 0,05 ccm erzeugten noch einen erheblichen Grad von passiver Anaphylaxie.

Nun würde das Intervall zwischen der intravenösen Injektion des Serums D_3 und der intravenösen Injektion des zugehörigen Antigens (Pferdeserum) auf **3 Min.** herabgesetzt. Um alle Bedingungen so zu gestalten wie in den Versuchen von *Friedberger* und *Seidenberg*, wurden beide Injektionen in die gleiche Jugularvene ausgeführt und die Kanüle der Injektionsspritze in der betreffenden Jugularis belassen; ausgewechselt wurde aber natürlich die Spritze selbst d. h. es wurde für das Immunserum und für das Antigen jedesmal eine besondere, ausgekochte

daß die Latenz bei der *heterologen* passiven Präparierung nicht auf dem Gehalte der Immunsera an artfremdem Protein im Sinne von *Friedberger* und *Hjelt* beruhen kann. Was den ersten Teil der Aussage anbelangt, ist zu berücksichtigen, daß in der Versuchsanordnung von *Friedberger* und *Seidenberg* zwischen die Zufuhr von Antiserum und Antigen noch immer ein Zeitintervall (bis zu 5 Minuten) eingeschaltet war; die humorale Theorie der Anaphylaxie würde verlangen, daß auch *Gemische der beiden Reaktionskomponenten* (unter Vermeidung der als sog. Anaphylatoxinbildung bekannten Giftung des artgleichen Serums!) Schock hervorrufen und daß die *Umdrehung der Reihenfolge der Zufuhr* (zuerst Antigen, dann Antiserum) ebenfalls ein positives Ergebnis liefert.

Was die Bemerkung betrifft, daß durch die Versuche von *Friedberger* und *Seidenberg* über die Latenzperiode der passiven Anaphylaxie das *wesentlichste Argument der cellulären Theorie* widerlegt sei, verweisen wir auf die zusammenfassenden Darstellungen von *Doerr* (Weichardts Ergeb., 5. 1922, Archiv f. Dermatol. u. Syphilis 1925, Idiosynkrasien in Stähelins Handb. der inneren Medizin, 4. 1926, Schweiz. med. Wochenschr. 1925); wenn auch das genannte Phänomen in der Entstehungsgeschichte der cellulären Hypothese eine bedeutende Rolle gespielt hat, ist es heute doch gegenüber anderen, durchaus beweiskräftigen Tatsachen und Überlegungen stark in den Hintergrund getreten. Die celluläre Theorie der Anaphylaxie und anderer Formen

---

Spritze verwendet. **Nicht ein einziges Mal waren bei dieser Versuchsanordnung auch nur Andeutungen einer Schockwirkung zu konstatieren:**

1,0 ccm	Serum	D_3	iv., nach	3 Min.	0,2 ccm	Pferdeserum iv.	0
0,5 „	„	D_3	„ „	3 „	0,2 „	„ „	0
0,5 „	„	D_3	„ „	3 „	0,2 „	„ „	0
0,3 „	„	D_3	„ „	3 „	0,2 „	„ „	0
0,2 „	„	D_3	„ „	3 „	0,2 „	„ „	0

Schließlich wurde für dieses Serum (D_3) und zwar für die intravenöse Präparierung mit 0,3 ccm und für die intravenöse Reinjektion mit 0,2 ccm Pferdeserum die effektive Dauer der Latenzperiode bestimmt:

0,3 ccm	D_3	iv., nach	5 Min.	0,2 ccm	Pferdeserum iv.	0
0,3 „	D_3	„ „	1 Std.	0,2 „	„ „	0
0,3 „	D_3	„ „	2 „	0,2 „	„ „	0
0,3 „	D_3	„ „	7 „	0,2 „	„ „	schwerster Schock, agonal, richtet sich aber wieder auf und überlebt.
0,3 „	D_3	„ „	12 „	0,2 „	„ „	+ 2 Min.

In Anbetracht dieser gans eindeutigen Resultate halten wir die Behauptung von *Friedberger* und *Seidenberg* betreffend das Fehlen der Latenzperiode bei der homologen passiven Anaphylaxie des Meerschweinchens *für widerlegt;* übrigens ist in dieser Zeitschrift inzwischen auch eine Mitteilung von *Schwarzmann* erschienen, die gleichfalls zu einem durchaus ablehnenden Schlusse kommt.

allergischer Überempfindlichkeit ruht derzeit auf einer soliden Basis, die durch einzelne, scheinbar widersprechende und noch nicht ganz aufgeklärte Beobachtungen nicht erschüttert werden kann. Darauf hier genauer einzugehen, würde nur eine Wiederholung von oft Gesagtem bedeuten und paßt auch nicht in den Rahmen dieser der Hauptsache nach experimentellen Arbeit.

Wohl aber erscheint es uns zweckmäßig, auf zwei wenig gewürdigte Momente kurz hinzuweisen.

Die Gegner der cellulären Theorie behaupten, daß ein Beweis für die Verankerung des passiv einverleibten anaphylaktischen Antikörpers bis jetzt überhaupt nicht erbracht wurde (*Friedberger*, *Ak. Shiga* u. a.). *Dale* hat aber gezeigt, daß der blutfrei gespülte Uterus heterolog passiv präparierter Meerschweinchen in den ersten auf die Einverleibung des Antikörpers folgenden Stunden auf Antigenkontakt nicht reagiert, daß aber die anaphylaktische Kontraktion ohne weiteres erzielt werden kann, wenn man den Ablauf der Latenzperiode abwartet; in beiden Fällen wird der zirkulierende Antikörper samt dem „artfremden Eiweiß", an dem er haftet, fast restlos ausgeschaltet. Vom Standpunkt der cellulären Theorie ist diese Beobachtung selbstverständlich; man kann sie aber weder mit der Annahme eines rein humoralen Prozesses noch mit der angeblichen „Auslöschwirkung" artfremder Proteine (*Friedberger* und *Hjelt*) irgendwie in Einklang bringen. Jede neue Hypothese über das Wesen der Latenzperiode hat sich mit diesem Experiment abzufinden und darf nicht einfach darüber hinweggehen.

Zweitens aber sollte man sich endlich darüber klar werden, daß eine „Empfindlichkeit" (sei es nun eine normale, eine verminderte oder eine gesteigerte) überhaupt nicht „passiv übertragen" werden kann. Diese Ausdrucksweise hat in der Anaphylaxieforschung erhebliche Verwirrung angerichtet. Wenn ein anaphylaktisches Tier auf die Injektion des spezifischen Antigens z. B. Pferdeserum so außerordentlich stark, ein normales gar nicht (d. h. nicht mit momentanen Symptomen) reagiert, so beruht das natürlich nicht darauf, daß die Gewebe des ersteren **gegen den Reiz des Pferdeserums** „überempfindlich" sind; sie werden nicht durch Pferdeserum, sondern durch eine davon ganz verschiedene Noxe, nämlich durch die Antigen-Antikörper-Reaktion geschädigt, eine Noxe, die im normalen Organismus gar nicht zur Entwicklung kommen kann. Deshalb sind ja die Schockphänomene immer die gleichen und von der Natur des schockauslösenden Antigens völlig unabhängig. Ein Vergleich der Reizempfindlichkeit des normalen und des anaphylaktischen Tieres ist an die unerläßliche Voraussetzung gebunden, daß die Reizqualität in beiden Fällen dieselbe ist; das trifft aber eben nicht zu, mag man nun einen humoralen oder einen zellständigen, einen physikalischen oder einen chemischen (toxigenen) Prozeß als Ursache

der anaphylaktischen Zellschädigung annehmen. Was bei der passiven Anaphylaxie übertragen wird, ist nicht eine „Überempfindlichkeit", sondern eine der Komponenten der Antigen-Antikörper-Reaktion, welch letztere auf die *Gewebe aller Tiere der gleichen Spezies unter gleichen Bedingungen gleich intensiv einwirkt*, da die Empfindlichkeit der Gewebe für die Reaktion **von Haus aus** gleich groß ist. Im passiv anaphylaktischen Experiment suchen wir den Antikörper unter die für die cytotoxische Auswirkung der Antigen-Antikörper-Reaktion notwendigen Bedingungen zu versetzen und machen die stillschweigende Voraussetzung, daß diese Bedingungen dieselben sein müssen, unter welchen der Antikörper im aktiv sensibilisierten Tiere tatsächlich vorhanden ist. Trifft diese Voraussetzung zu, so muß der Antikörper zellständig sein, denn wir kennen Fälle von aktiver Anaphylaxie, in welchen das zirkulierende Blut antikörperfrei ist.

Zusammenfassung.

1. Die Serumanaphylaxie beruht auf einer Eiweiß-Antieiweiß-Reaktion. Eine Reaktion zwischen Serumlipoiden und ihren Antilipoiden kommt nicht in Betracht.

2. Die Latenzperiode der heterologen passiven Anaphylaxie des Meerschweinchens läßt sich nicht auf eine hemmende (auslöschende) Wirkung des im passiv präparierenden Kaninchenimmunserum enthaltenen artfremden Proteins zurückführen.

3. Die Latenzperiode kann auch bei der homologen passiven Anaphylaxie des Meerschweinchens (Präparierung mit artgleichem Immunserum) nachgewiesen werden. Die Angabe von *Friedberger* und *Seidenberg*, daß die Latenzperiode bei dieser Versuchsanordnung nicht existiert, wenn man mit hochwertigem homologen Immunserum sensibilisiert, ließ sich nicht bestätigen.

4. Das passiv anaphylaktische Experiment darf nicht als eine passive Übertragung einer Überempfindlichkeit definiert werden, wenn man unter Überempfindlichkeit die *gesteigerte Empfindlichkeit identischer Gewebe gegen einen identischen Reiz* versteht. Das anaphylaktische Tier reagiert nicht auf das schockauslösende Antigen, sondern auf eine davon verschiedene Noxe, nämlich auf die Antigen-Antikörper-Reaktion, für welche die Zellen der Tiere einer Spezies eine stets gleichbleibende Empfindlichkeit besitzen.

Literaturverzeichnis.

Friedberger und *Hjelt*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **39**. 1924. — *Shiga, A. K.*, Ebenda. — *Doerr* und *Russ*, Ebenda **3**. 1909. — *Friedberger* und *Seidenberg*, Klin. Wochenschr. 1925, S. 1823. — *Doerr* und *Hallauer*, Schweiz. med. Wochenschr. 1925. — *Doerr*, Weichardts Ergebnisse **5**. 1922. — *Doerr*, Idiosynkrasien in Staehelins Handb. der inneren Medizin 1926. — *Dale*, Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. **4**. 1913.

Die Streckerschwäche bei Bleieinwirkung.

Von

Dr. **Ludwig Teleky** und **Walther Schulz,**
Landesgewerbearzt. Assistent am Rheinischen Provinzial-Institut für Arbeits- und Berufsforschung, Düsseldorf.

Mit 3 Textabbildungen.

Allgemein bekannt ist, daß das Blei eine Wirkung auf die Hand- und Fingerstrecker ausübt. Seit Jahrzehnten prüfen englische Gewerbeaufsichtsbeamte die Stärke der Strecker. Ich selbst (*Teleky*) habe viele Jahre lang in der gebräuchlichen etwas derben Art diese Prüfung vorgenommen. Da durch diese Art der Untersuchung — gewaltsames Herabdrücken der bei gestreckten Fingern im Handgelenk überstreckten Hand — nur recht grobe und weiter vorgeschrittene Streckerschwäche sich feststellen läßt, so kam ich, angeregt vor allem durch die auf dem Internationalen Kongreß für Berufskrankheiten in Mailand gemachten kurzen Andeutungen *Gliberts* über häufig beobachtete Streckerschwäche bei Bleiarbeitern[1]) auf den Gedanken, darauf zu achten, ob sich nicht bei Bleiarbeitern durch geeignete Untersuchung auch schon geringere Grade der Streckerschwäche feststellen ließen. Eine Prüfung der aktiven Überstreckbarkeit der Hände im Handgelenk und Schätzung des hierbei erreichbaren Winkels mußte deshalb von vornherein als nicht zum Ziele führend angesehen werden, weil bei verschiedenen Menschen die Beweglichkeit dieses, sowie ja auch der verschiedensten anderen Gelenke, eine sehr verschiedene ist. Zwar ist es recht gut möglich, passiv bei gebeugten Fingern die Beweglichkeit des Handgelenks zu prüfen und Vergleiche der auf diese Weise möglichen, nur durch das Gelenk und seinen Bandapparat begrenzten Beweglichkeit mit der aktiven, also durch die eigene Muskeltätigkeit möglichen anzustellen. Aber diese Methode ist weit davon entfernt, auch schon geringere Grade erkennen zu lassen. Nun ist es seit jeher bekannt, daß Bleilähmung an der Arbeitshand, also bei den meisten Menschen an der rechten Hand, früher und schwerer auftritt als an der linken. Ich

[1]) Auf die diesen Andeutungen zugrunde liegende Arbeit, die mir erst kurz vor Abschluß der vorliegenden Arbeit und nach der Berichterstattung über ihre Ergebnisse auf dem Kongreß für Unfallheilkunde und Berufskrankheiten in Amsterdam durch die Liebenswürdigkeit Herrn *Gliberts* zur näheren Kenntnis kam, soll später eingegangen werden.

selbst habe vor Jahren in einer größeren Arbeit den engen Zusammenhang zwischen Ermüdung und Lokalisation der Bleilähmung (Edingersche Aufbrauchtheorie) studiert (Dtsch. Zeitschr. f. Nervenheilk. *37*). Es lag also der Gedanke nahe, darauf zu achten, ob vielleicht ein *Vergleich der aktiven Überstreckbarkeit beider Hände* zu einem Ergebnis führen könnte, ob nicht eine auftretende Schwäche sich stärker an der Arbeitshand zeigen würde.

Meine ersten Beobachtungen hierüber habe ich Ende 1922 und Anfang 1923 angestellt (Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 19). Bei Prüfung der „Streckerschwäche" gehe ich in der Art vor, daß ich die Arme im Ellbogengelenk annähernd rechtwinklig beugen und so weit pronieren lasse, daß der Handrücken nach oben sieht, dann fordere ich den Untersuchten zur möglichsten Überstreckung im Handgelenk bei gestreckt gehaltenen Fingern auf. Um dieser Forderung Nachdruck zu verleihen, drücke ich auch unter Umständen die Hand passiv in möglichste Überstreckung und fordere den Untersuchten auf, diese Stellung möglichst beizubehalten, suche ihn also zur möglichst starken aktiven Anspannung seiner Strecker zu veranlassen. Dann blickt man von oben — nicht seitlich! — auf die Hände und erkennt so leicht, ob die beiden erreichten Winkel zwischen Arm und Hand gleich sind oder ob die eine Hand mehr zurückbleibt, der eine Winkel ein stumpferer ist. Unter Umständen sieht man auch ein leichtes Zurückbleiben, Hängen einzelner Finger, vor allem des 3. und 4. Fingers einer Hand, das dann manchmal von vorne unten oder seitlich besser zu sehen ist als von oben. Zu achten ist darauf, ob nicht ein mechanisches, die Bewegung behinderndes Moment an einer Hand besteht (Gelenksprozeß, Narbe u. dgl.). Um sich zu überzeugen, ob die Gelenke nicht mechanisch behindert sind, braucht man nur leicht die Faust schließen zu lassen und durch passive Bewegungen die Beweglichkeit des Gelenkes zu prüfen. Selbstverständlich ist auch darauf zu achten, ob eine sich herausstellende Streckerschwäche der einen Hand nicht durch irgend ein anderes die Muskeln schwächendes Moment: lange Erkrankung des Armes mit oder ohne Narbenbildung verursacht sein kann. Aber schließlich sind alle diese letzterwähnten Momente doch so selten, daß sie kein Hindernis für die allgemeine Anwendung der Methode bilden. Ich habe nun eine große Zahl Bleiarbeiter untersucht und sehr häufig diese Streckerschwäche der Arbeitshand, also meist der rechten Hand, gefunden. Ich habe dann 160 Kupferschmiede und Kesselschmiede untersucht. 10 von ihnen zeigten mechanische Behinderung im Handgelenk oder Narbenbildung; unter den restlichen 150 fand sich nur einer mit Streckerschwäche der rechten Hand. Ich konnte daraus mit Recht schließen, daß die Zahl der Nicht-Bleiarbeiter, die dieses Symptom darbieten, sehr gering ist. Überzeugend waren für mich dann die in den Städtischen Krankenanstalten

vorgenommenen Untersuchungen. Ohne den Beruf der Leute zu kennen, untersuchte ich 58 Männer der internen Klinik; 10 zeigten Streckerschwäche und von diesen konnte bei 8 Bleiarbeit in der Anamnese festgestellt werden. Ähnlich waren die Ergebnisse an der chirurgischen Klinik; von 54 Untersuchten waren 6 mit deutlicher, 2 mit fraglicher, nur ganz minimaler Streckerschwäche. Von den 6 ersterwähnten hatten 4 Bleiarbeit in der Anamnese. Bemerkenswert ist, daß die die Streckerschwäche verursachende Bleiarbeit nur in einem Teil der Fälle bis zur Krankenhausaufnahme gedauert hatte, in anderen aber schon viele Jahre zurücklag.

Ich habe dann in einer weiteren Arbeit (Die Symptome der Bleivergiftung, ihre Bedeutung für Frühdiagnose und Diagnose, Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 9) abermals, diesmal neben anderen Symptomen, das Vorkommen der Streckerschwäche studiert.

Es ergab sich dabei, daß von:

67 Fällen, die unter	1 Jahr mit Bleiarbeit beschäftigt waren,	40 Fälle	= 60%
39 „ „ über	1—3 Jahre „ „ „ „	26 „	= 66%
57 „ „ „	3 „ „ „ „ „	42 „	= 73%

Streckerschwäche aufwiesen. Besonders in einer Zinkhütte mit wenig Erkrankungen, aber vielen Arbeitern, die seit langen Jahren Bleiarbeit verrichteten, fand sich unter 20 Untersuchten 15mal Streckerschwäche. Ich kam zu dem Schluß, „daß *Streckerschwäche* ein Symptom ist, das zwar selten als erstes Symptom schon nach kurzer Arbeit auftritt; wir sehen sie *aber häufig sowohl als einziges Symptom als auch mit Änderung der Gesichtsfarbe* (Blässe oder Kolorit) *vereint* bei langjährigen Bleiarbeitern. Sie entwickelt sich auch in jenen Fällen, bei denen die Bleiaufnahme so sehr langsam erfolgt, daß es nicht zu eigentlich krankhaften Erscheinungen kommt. Wir konnten aber feststellen, daß die Streckerschwäche, einmal entstanden, eine gewisse Hartnäckigkeit aufweist".

Seitdem habe ich Bleiarbeiter in sehr großer Zahl untersucht und überall, wo Bleiarbeit verrichtet wurde, Streckerschwäche der rechten Hand (bei Linkshändern der linken) in den verschiedensten Berufen, bei Malern, in keramischen Betrieben, bei Bleigießern, bei Arbeitern an der Bleipresse von Kabelfabriken in einem sehr großen Prozentsatz gefunden. Besonders hervorgehoben sei, daß die 12 *Maler einer Steingutfabrik* sämtlich Streckerschwäche aufwiesen. Ich bin heute davon überzeugt, daß die in meiner ersten Arbeit angegebenen Zahlen noch hinter der Wirklichkeit zurückbleiben.

Meine Angaben haben aber weniger Nachprüfung als Ablehnung gefunden: nur *Hergt* (Zentralblatt für Gewerbehygiene 1924, September) hat angeblich meine Behauptungen nachgeprüft. In der Arbeit ist nicht die Zahl der Untersuchten angegeben; es heißt nur „viele" Bleilöter und „viele Hunderte von Kontrollen". Es wird ausführlicher die von mir früher geübte derbe Prüfungsmethode

beschrieben (von Wichtigkeit sei „die Beugung des Ellenbogengelenks, damit die Antagonisten auch völlig entspannt werden“[?]) und nur später kurz angegeben, daß Verf. sich genau an meine Vorschrift für die Untersuchung gehalten habe. In einer Erwiderung auf meine Entgegnung zu seinem Aufsatz behauptet *Hergt* dann, daß er sich genau an die von mir empfohlene und meinen Untersuchungen zugrunde gelegte Beobachtungsmethode hielt, wobei er feststellt, daß die von mir angewandte Methode „einfachste Anforderungen an Denkvermögen und Beobachtungsgabe“ stellt, so daß er nicht glauben kann, ich nähme ernstlich an, „daß es Ärzte gibt, die solch einfachen Ansprüchen nicht genügen könnten“.

Im Widerspruch zu dieser letztzitierten Auffassung, der ich mich gern anschließe, sagt *Lehmann* (Die deutsche Bleifarbenindustrie, S. 56), er habe bei seinen Untersuchungen auf das von mir angegebene Zurückbleiben der rechten Hand bei der Überstreckung nicht geachtet, „nachdem einige orientierende Versuche ergaben, daß die Sache zu kompliziert liege, um bei Massenuntersuchungen nebenbei entschieden werden zu können“. Er will vorläufig nur sagen, daß einer seiner Schüler Versuche bei Nicht-Bleiarbeitern angestellt habe, die ergaben, „daß die rechte Hand im allgemeinen eine geringere Bewegungsfähigkeit als die linke hat und daß der Unterschied um so größer zu sein pflegt, je stärker die Hände arbeiten“ — eine Angabe, die mit dem Befund *Hergts*, der bei Bleilötern, also doch zum Teil Schwerarbeitenden, nie Streckerschwäche der rechten Hand fand, in seltsamem Widerspruch steht. — Ich möchte betonen, daß ich gerade bei keramischen Malern, die doch nur feine und leichte Arbeit verrichten, sehr viel Streckerschwäche fand.

Schließlich hat sich *Boettrich* mit rein theoretischen Einwendungen und Erörterungen gegen meine Angaben gewandt; auf sie braucht, da sie sich nicht auf Versuche einer Nachprüfung stützen, hier nicht eingegangen zu werden.

Erwähnt sei nur noch, daß nach einer aus den Jahren 1912/13 stammenden (also noch auf einer der derben Untersuchungsmethoden fußenden) Angabe *Curschmanns* (*Teleky*, *Gerbis*, *Schmidt*, Die Frühdiagnose der Bleivergiftung, Berlin 1919) dieser bei 22% seiner Bleikranken die Überextension der rechten Hand gegenüber der Norm erschwert fand, daß weiter *Heim de Balzac*, *Agasse-Lafont* und *Feil* (Bull. med. **39**, Nr. 37. 1925) bei 42% der von ihnen untersuchten Akkumulatorenarbeiter (Streicher und Mischer) bei Anwendung meiner Methode Streckerschwäche fanden.

Nicht zum wenigsten die oben erwähnte, meist nicht auf Nachprüfung beruhende, sondern gefühlsmäßige Ablehnung meiner Angaben veranlaßte mich, nach einer Methode zu suchen, die eine möglichst exakte Prüfung der Stärke der Strecker ermöglichte. Ich sah diese Methode in einer Prüfung der möglichen Arbeitsleistung der Streckmuskulatur mit dem *Ergographen* und war sehr glücklich, in Herrn *Walther Schulz* einen in derartigen Untersuchungen sehr erfahrenen Mitarbeiter gefunden zu haben. Die hierbei zu überwindenden Schwierigkeiten waren allerdings nicht gering; sie ergaben sich vor allem aus der Beschränktheit der Methode und der noch geringen Durchforschung ihrer Verwendungsmöglichkeiten, dazu kamen noch technische Schwierigkeiten.

Keiner der uns bekannten bisher von den verschiedensten Autoren vorgenommenen ergographischen Versuche hat sich die Aufgabe gestellt, die Leistungsfähigkeit verschiedener Muskelgruppen zu vergleichen[1]; das Ziel ihrer Untersuchungen war vielmehr, physiologische und daneben psychologische Fragen der „Ermüdung" zu studieren. Die Bestimmung der Leistungsfähigkeit der Muskeln, der Vergleich zweier Muskelgruppen miteinander bietet auch gewisse Schwierigkeiten und ist überhaupt nur in sehr bestimmten Grenzen durchführbar.

Ein Maß für die Leistungsfähigkeit des Muskels kann uns nur die von ihm geleistete Arbeit geben. Welche äußere Arbeit er zu leisten imstande ist, hängt aber nicht nur von seiner Masse, sondern auch davon ab, an welchen Hebeln er (unter physiologischen Verhältnissen, nicht als isolierter herausgeschnittener Muskel) seine äußere Wirkung zur Geltung bringt, wie die rein mechanischen Bedingungen seiner Tätigkeit sind. Hiervon aber könnte man beim Vergleich vielleicht mit Rücksicht darauf, daß dies wenigstens bei einem und demselben Individuum für die einzelnen Muskeln meist konstante beziehungsweise sich bei bestimmten Bewegungen gesetzmäßig ändernde Verhältnisse sind, absehen.

Weiter ist noch folgendes zu berücksichtigen:

Jeder stärkeren Bewegung einer Muskelgruppe wirkt der Tonus ihrer Antagonisten entgegen, starke Beugung im Handgelenk führt vielleicht neben einer aktiven (*Bethe*) jedenfalls zu einer passiven Dehnung der Streckmuskeln, deren Tonus der Dehnung entgegenwirkt. Dieser Widerstand gesellt sich zu dem des zu hebenden Gewichts hinzu. Die durch die Muskelkontraktion selbst mögliche Bewegung, die maximale Einzelhubhöhe, erfährt aber eine Einschränkung nicht nur durch das eben genannte Moment, sondern außerdem durch Spannung der übrigen Weichteile und insbesondere durch den mechanischen Bau des Gelenks. Der einzelnen Hubhöhe ist so eine gewisse Grenze gesetzt, die unabhängig ist von der Stärke des Muskels und von der Schwere des Gewichts. Im Bestreben der Überwindung dieser Widerstände und dieser Grenzen wird ein Stück Arbeit nutzlos vergeudet. Auch dieses Moment bringt eine Ungenauigkeit in dem Vergleich verschiedener Muskelgruppen bei derselben Versuchsperson.

Schlimmer ist ein anderer Umstand. Die Schnelligkeit mit der Erschöpfung eintritt, wird bestimmt durch die Größe der Last, die Hubhöhe und den Rhythmus, in dem die Hebungen erfolgen. Da das Maximum der Hubhöhe durch mechanische Verhältnisse des Körpers bedingt, also etwas Gegebenes ist, so hängt, wenn mit maximaler Hubhöhe ge-

[1]) Auf andere Art und mit eigenartiger Apparatur haben mittels besonderer Dynamometer *Bethe* (Münch. med. Wochenschr. 1916, Nr. 45; 1917, Nr. 31 u. 51) und *Franke* (Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **184**; 1920) Muskelkraft und Kraftablauf einzelner Muskelgruppen bestimmt.

arbeitet wird, die Raschheit, mit der Ermüdung (ein Nichtmehrerreichen dieser Höhe) eintritt, von der Größe der Last und dem Rhythmus ab. Es läßt sich aber nun für jede Last ein Rhythmus finden, bei dem theoretisch wenigstens die Bewegung ins Unendliche fortgesetzt werden kann, ohne daß Ermüdung eintritt. *Treves* nennt das Gewicht, mit dem man schließlich, nachdem Versuche mit anderen Gewichten vorangegangen sind, bei gleichbleibendem Rhythmus und gleichbleibender (nicht in obigem Sinne maximaler) Hubhöhe praktisch gesprochen, eine unendliche Zahl von Hebungen durchführen kann, das „Endmaximalgewicht" und diesen Teil der Kurve die „konstante Phase"[1]). Ob es möglich wäre, die Leistungsfähigkeit verschiedener Muskeln dadurch miteinander zu vergleichen, daß bei gleicher Einzelhubhöhe und bei gleichem Rhythmus das Endmaximalgewicht für jeden Muskel bestimmt wird, erscheint schon deshalb höchst fraglich, weil nicht nur das „Eigentempo" verschiedener Personen, sondern vielleicht auch das derselben Person für verschiedene Verrichtungen, von dem für alle gleichgewählten Tempo verschieden weit und vielleicht auch nach verschiedenen Richtungen hin entfernt wäre. Auch die gleiche Hubhöhe hätte sowohl für verschiedene Muskeln als auch zum Teil für verschiedene Personen verschiedene Bedeutung. Abgesehen davon, daß aber derartige Versuche bisher nicht vorliegen, müßte die Vornahme solcher Untersuchungen mit ungeübten Versuchspersonen auf die größten Schwierigkeiten stoßen, da ja die konstante Phase durch sehr lange Zeit fortgeführt werden muß, um sicher zu sein, daß nicht schließlich doch ein Abfallen der Hubhöhe eintritt, daß wir es wirklich mit dieser Phase zu tun haben. Ein derartig lange ausgedehnter Versuch wäre aber bei Versuchspersonen wie den unsrigen unmöglich.

Wir haben deshalb Gewichte gewählt, die uns nach den Vorversuchen ein störungsloses Arbeiten und eine relativ rasch verlaufende Ermüdungskurve zu verbürgen schienen und sind in der Weise vorgegangen, daß wir die Versuchspersonen im selben Rhythmus bis zur Erschöpfung mit einem Gewicht arbeiten ließen, dann nach 2 Minuten Pause mit einem leichteren, nach abermals 2 Minuten Pause mit einem noch geringeren. Die Gewichte haben wir so gewählt, daß auch das leichteste einen verhältnismäßig raschen Abfall der Ermüdungskurve hervorrief, also von der „konstanten Phase" noch weit entfernt war. Wir haben deshalb mit Pausen von 2 Minuten gearbeitet, weil diese nach den Untersuchungen von *Oseretzkowsky* und *Kraepelin* sich zweckmäßig gezeigt haben. Wir haben dann die in jedem dieser 3 Absätze jedesmal bis zur Erschöpfung geleistete Arbeit durch

[1]) Diese Betrachtungsweise *Treves'* gilt vor allem für den ergographischen *Versuch*, denn tatsächlich tritt ja auch ohne jede Arbeitsleistung Ermüdung, Ruhe- und Schlafbedürfnis ein, so daß eine Arbeitskurve nie ins unendliche gehen, die Arbeitsleistung nie unendlich groß sein kann.

Multiplikation der gesamten Hubhöhe mit dem entsprechenden Gewicht berechnet.

Dieser Art der Betrachtung haften manche Mängel an. Vor allem wird, da die Personen angewiesen waren, das Gewicht nicht jäh herabschnellen zu lassen, sondern diesem Zug allmählich nachzugeben, auch hierbei eine gewisse Arbeit geleistet, aber immer noch geschah dabei das Nachlassen recht schnell und da wir die schnell rotierende Trommel benutzten, so hätte die Berechnung des Flächeninhaltes des von Hebungs- und Senkungslinie eingeschlossenen Raumes kein nennenswert anderes Resultat ergeben als die Berechnung der Hubhöhe. Diese Fehlerquelle ist also so gering, daß sie mit Recht vernachlässigt werden kann. Ein anderer Mangel aber ist der folgende: da wir nicht wissen, welches in den einzelnen Fällen das Endmaximalgewicht ist, bei dem die geleistete Arbeit die größte (= unendlich) wäre, wir aber natürlich annehmen müssen, daß es bei verschiedenen Personen ein verschiedenes wäre, so liegt ein Fehler darin, daß wir alle Personen mit den gleichen Gewichten prüften. Wir können demnach die bei verschiedenen Personen erhaltenen Arbeitsleistungen nicht ohne weiteres als Maß ihrer Leistungsfähigkeit miteinander vergleichen, insbesondere da die Kräfte der untersuchten Personen — wie aus den Dynamometerversuchen hervorgeht — sehr verschieden waren. Aus demselben Grunde wäre der Vergleich verschiedener Muskeln derselben Person nicht möglich, wozu noch der oben erwähnte, bei verschiedenen Bewegungen verschieden große, zu überwindende Widerstand der Weichteile und des Tonus der Antagonisten kommt. Wenn wir aber *dieselben Muskeln derselben Person rechts und links* in Betracht ziehen, so kann der sich ergebende Fehler nur gering sein. Allerdings könnte eingewendet werden, daß an der schwächeren Seite die Gewichte relativ zu schwer wären, also die Erschöpfung an dieser Stelle relativ früher eintritt als an der kräftigeren, die Differenzen also zu groß erscheinen. Vielleicht, daß dieser Einwand gerade dort vorgebracht werden kann, wo sich größere Differenzen in der Stärke der Muskeln ergeben; auf keinen Fall aber könnte dieser Umstand dazu führen, daß uns die Verhältnisse umgekehrt, also tatsächlich stärkere Muskeln schwächer erscheinen.

Diese Erwägungen zeigen uns also, daß ein *Vergleich derselben Muskeln* (Strecker oder Beuger) an der *rechten und linken Hand derselben Versuchsperson möglich ist* und, wenn auch vielleicht nicht zahlenmäßig *vollkommen* exakte, so doch verläßliche Resultate ergibt.

Um aber eine Leistungsmessung der uns interessierenden Muskeln, vor allem der langen Hand- und Fingerstrecker durchführen zu können, mußten noch technische Schwierigkeiten überwunden werden.

Während der älteste Apparat von *Fick* (1887) die Stärke des Musc. abductor indicis (Interosseus dorsal. I), der *Mossos* die Stärke des Mittelfingeranteils der

Musc. flexores digitorum sublimis und profundus, der von *Dubois* die Stärke der Beuger des Zeigefingers, der Armergograph von *Treves* die Stärke der Beuger des Unterarmes, der von *Polimanti* die Dorsal- und Plantarflexion des Fußes, der von *Weber* die Dorsalflexion des Fußes prüft (vgl. *Zoth*, Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Abt. V, Teil 5a, H. 1), handelte es sich uns darum, die die Hand im Handgelenk überstreckenden Muskeln zu untersuchen.

Da die Überstreckung bei gebeugten Fingern viel leichter und auch in größerem Umfange durchgeführt werden kann, während bei gestreckten Fingern die Überstreckung im Handgelenk schwieriger und nicht in demselben Maße durchführbar ist — überstreckt man aktiv oder passiv möglichst stark die Hand im Handgelenk, so tritt unwillkürlich Beugung der Finger ein — feinere Störungen sich auch bei Prüfung mit gestreckten Fingern zuerst bemerkbar machen, so kam es uns vor allem darauf an, die Leistungsfähigkeit der Muskelgruppen, die bei *gestreckten* Fingern die Hände im Handgelenk überstrecken, zu prüfen.

Die Extensores carpi radial. longus und brevis und der Extensor carpi ulnaris allein wirken bei gebeugten Fingergelenken als Handstrecker; bei Überstreckung im Handgelenk bei *gestreckten* Fingern treten aber auch, wie man sich durch Auflegen der Hand auf die Dorsalseite des Unterarmes leicht überzeugen kann, die langen Fingerstrecker in Tätigkeit. Günstig gegenüber der von *Mosso* vorgenommenen Prüfung der Kraft des Mittelfingers ist, daß ein Umstand, auf den *Treves* (Pflügers Archiv 88) vor allem aber *Gruhle* (Psych. Arbeiter 6) aufmerksam gemacht hat, hier nicht so stark ins Gewicht fällt. Insbesondere dieser letztere weist darauf hin, daß am gewöhnlichen *Mosso*schen Ergographen von einer Muskelgruppe, die stets gemeinsam innerviert wird, nur einzelne Muskeln geprüft werden, während die Wirkung der andern durch die entsprechenden Vorkehrungen gehemmt wird. Aber auch an diese geht der Reiz vom Zentralorgan, auch diese beteiligen sich am Stoffumsatz und damit am Zustandekommen der Ermüdung. Dieser Umstand beeinflußt das Resultat unserer Untersuchungen wenig, da eine Muskelgruppe gemeinsam geprüft wird, die zusammen zu arbeiten gewohnt ist und da von dieser Muskelkontraktion keine sonst stets mitarbeitenden Muskeln ausgeschlossen werden. Hingegen fällt wohl recht sehr ins Gewicht, daß bei dieser Überstreckung der Tonus der Handbeuger, insbesondere aber auch — und dies erklärt warum jeder Grad der Streckerschwäche am deutlichsten bei gestreckten Fingern hervortritt — der sehr kräftigen langen Fingerbeuger, deren Wirkung an Mittel- und Endphalange einsetzt, überwunden werden muß. Vielleicht auch, daß dieser Tonus bei der von uns geprüften Bewegung etwas erhöht ist, weil bei der am häufigsten ausgeführten Bewegung des Faustschlusses stets Handstrecker und Fingerbeuger gleichzeitig innerviert werden.

Da wir die Stärke der Strecker der Hand bei gestreckten Fingern prüfen wollten, so ließen wir zunächst die Wirkung des Gewichtes an

den Grundphalangen einsetzen, was durch eine Art Klammer, die innen gut gepolstert war, leicht bewerkstelligt werden konnte. Aber schon nach wenigen Hebungen, sowie etwas Ermüdung eintrat, beugten die Versuchspersonen unwillkürlich entgegen unserem Auftrage in den Grundgelenken. Wir mußten also dazu kommen, dies durch Schienung der Hand und Finger unmöglich zu machen, was sich durch je eine von rechts nach links leicht gewölbte Schiene an Beuge- und Rückenfläche, die an beiden Seiten durch Schnürung verbunden waren, leicht erreichen ließ. Es mußte nur einerseits dafür gesorgt werden, daß die Schienen durch Anziehen der Schnüre so fest saßen, daß sie sich während der



Abb. 1.

Versuchsdauer nicht verschieben konnten und daß andererseits die Klammer, an der das Gewicht hing, stets in derselben Höhe über den 2. bis 4. Fingern saß (wir wählten die Höhe der Mittelphalangen der geschienten Finger), damit bei der Versuchsperson während aller Versuche die mechanischen Bedingungen (Länge des Hebels) die gleichen blieben. Um nachträgliche Verschiebung der Klammern während der Arbeit zu vermeiden, mußten die Schienen an ihrer Außenfläche angerauht werden, was mittels mehrerer Bohrungen erreicht wurde. War dies recht einfach, so gestaltete sich die entsprechende Fixation des Unterarmes ungemein schwierig. Sowie nur leichte Ermüdung sich einstellte, traten *neben* die Streckbewegung im Handgelenk, die ja allein geprüft werden sollte, bei starker Ermüdung an *Stelle* dieser mannigfache Bewegungen von Auxilliarmuskeln, die alle zur Hebung des Gewichtes beitrugen oder beitragen sollten: Pronationsbewegungen,

Vorschieben und seitliche Verschiebung des ganzen Armes, kurz: durch Inanspruchnahme der Muskulatur des Oberarmes und der Schulter, ja selbst durch Bewegungen des ganzen Körpers wurde die nachlassende Kraft der Streckmuskeln ersetzt. Die ursprünglich versuchte Fixation des Unterarmes durch zwei Riemen erwies sich als gänzlich unzureichend; etwas stärker angezogen, schnitten trotz Polsterung die Riemen ein und bereiteten störende Schmerzen. Auch der Versuch, einen Schienenverband mit je einer Schiene an Strecker- und Beugerseite des Unterarmes anzulegen und den so geschienten Unterarm mittels zwei Riemen

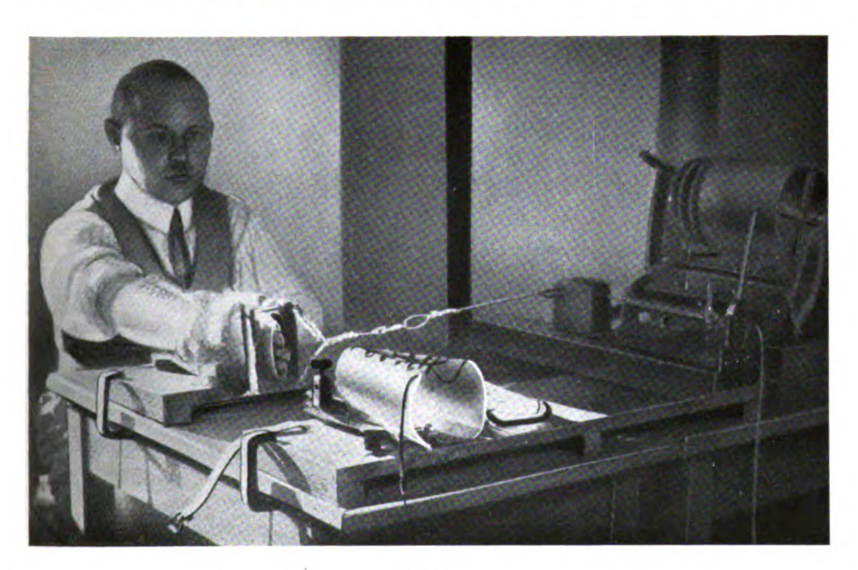


Abb. 2.

am Apparat zu fixieren, führte zu keinem Resultat; die Riemen gestatteten noch immer zu viel Mitbewegungen des Unterarmes. Schließlich kamen wir dazu, am Apparat selbst die eine Schiene unverrückbar zu fixieren, während die zweite Schiene mit dieser an der unteren Seite gelenkig, an der oberen Seite durch einen Schnürzug verbunden war. Diese Schienen umfaßten den ganzen Unterarm bis einige Zentimeter oberhalb des Handgelenkes. Diesem untersten Teil des Unterarmes wurde eine dicke Manschette von Zellstoff angelegt und hier eine weitere Fixation durch einen Riemen vorgenommen, wobei natürlich auf freieste Bewegungsmöglichkeit des Handgelenkes gesehen werden mußte. Selbstverständlich mußte die Anlegung des gesamten Apparates und Fixierung des Unterarmes und der Finger stets so erfolgen, daß einerseits jede Nebenbewegung unmöglich war, andererseits auch bei Bewegungen nirgends ein Druckschmerz entstand, auch mußte für die rechte und

die linke Hand je eine besondere Hülsenvorrichtung vorgesehen werden, die an der Apparatur genau symmetrisch angebracht waren, so daß sie sich in gleicher Entfernung von einer über eine Rolle geleiteten und im rechten Winkel zur eigentlichen Zugrichtung abgebogenen Schnur befanden. Mittels des gebräuchlichen Schreibers wurden die Bewegungen auf den berußten, um die Ergographentrommel ziehenden Papierstreifen aufgezeichnet. Die Trommel selbst und die auf ihr entstehende Zeichnung waren für die Versuchsperson durch eine aufge-

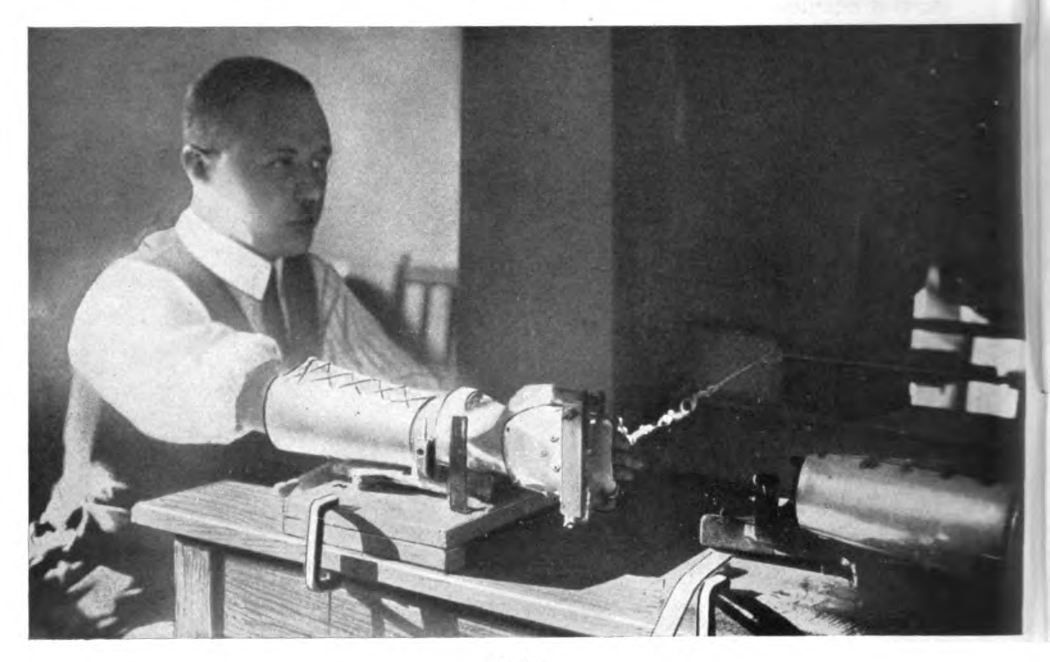


Abb. 3.

stellte Pappdeckelwand verstellt, so daß die Versuchspersonen keine Kontrolle über ihre Leistung während der Arbeit hatten. Die Abb. 1—3 zeigen wohl deutlich unsere Versuchsanordnung. Bemerkt sei, daß die abgebildete Person nicht eine Versuchsperson, sondern ein Mitarbeiter des Kölner Berufsamtes ist, das uns in entgegenkommendster Weise einen Teil der Apparate und einen Arbeitsraum zur Verfügung stellte, wofür ihm auch hier der beste Dank ausgesprochen sei.

Die Beschaffung der Versuchspersonen erfolgte in der Art, daß wir den Betriebsratsvorsitzenden eines Betriebes, in dem zahlreiche Arbeiter der Einwirkung von Blei ausgesetzt sind, ersuchten, uns Bleiarbeiter und den Obmann der Buchdruckerorganisation uns Schriftgießer und Stereotypeure zur Untersuchung zu senden. Es kamen so als „Blei-

arbeiter" zur Untersuchung: Bleilöter und Stereotypeure. Von den Nicht-Bleiarbeitern, die zur Untersuchung kamen, war einer in einer ganz anderen Abteilung des erstgenannten Betriebes beschäftigt (Gummiarbeiter), die übrigen wurden mir vom Deutschen Metallarbeiterverband zugesandt und waren erwerbslose Mitglieder desselben: Lokomotivführer, Schlosser, Monteure. Allen den genannten sei hier für ihre Mitarbeit bestens gedankt. Sowohl den uns die Leute zusendenden Stellen, als auch den Versuchspersonen selbst, war nur bekannt, daß es sich um eine Untersuchung der Muskelkraft bei Blei- und Nicht-Bleiarbeitern handle; *worauf es bei der Untersuchung ankam, auf Vergleich welcher Muskelgruppen*, ob auf Vergleich beider Hände und Arme, *wußten weder die genannten Vertrauensleute der Arbeiter noch die Versuchspersonen* selbst vor Abschluß *sämtlicher* Untersuchungen. Es wurde auch *keinerlei Auswahl* der Versuchspersonen von den uns diese zusendenden Stellen, noch von uns selbst getroffen, *außer* der, daß die einen Bleiarbeiter sein mußten, die anderen nie der Bleieinwirkung ausgesetzt gewesen sein durften, und daß keiner eine Verstümmelung der Hände oder eine Verletzung von Hand oder Unterarm, die irgendwelche Folgen hinterließ (außer belanglosen oberflächlichen kleinen Hautnarben) oder länger dauerte, erlitten haben durfte. Auf das Vorhandensein dieser beiden Voraussetzungen prüften wir vor Beginn der Untersuchung jede Versuchsperson. Einzelne, bei denen sich hierbei das Fehlen eines Fingergliedes oder das Vorhandensein einer Narbe ergab, wurden vor Beginn der Untersuchung ausgeschieden. Nur bei einem (Bleiarbeiter Nr. 9) war uns das Vorhandensein zweier Narben in der Schultergegend entgangen, er zeigte als Kriegsverletzung eine kleine Einschußnarbe über der R. Clavicula, eine kleine Ausschußnarbe am Rande des M. pectoralis in der Achselhöhle.

Jeder Untersuchung ging die Erhebung einer kurzen, vor allem *beruflichen Anamnese* voraus. Auf diese folgte stets zur allgemeinen Orientierung über die grob motorische Kraft (Handschlußkraft) über Arbeitswillen und Arbeitstyp eine *Dynamometeruntersuchung* (Modell Lehmann) in der gebräuchlichen Art. Nach vorangegangener Instruktion wurde in einem Intervall von je 10″ auf Kommando, dem aber kein Ansporn in bezug auf Mühewaltung gegeben wurde, abwechselnd rechts und links, im ganzen 40mal gedrückt. Die Beobachtung der Arbeiter durch den Versuchsleiter (*Schulz*) zeigte, daß der Arbeitswille im ganzen ein guter war und im allgemeinen auch keine besonderen Schwankungen aufwies. Weiterhin ergaben die Dynamometermessungen in keinem Falle Ermüdung in bezug auf die Kraftleistung über den Normalverlauf hinaus. Es wurden die durchschnittlichen Werte der je 20 Hebungen der rechten und der linken Hand berechnet und folgendes festgestellt (Tab. 1):

Tabelle 1. *Ergebnisse der Dynamometerversuche.*

Nichtbleiarbeiter			Bleiarbeiter		
Nr. der Versuchsperson[1])	rechts	links	Nr. der Versuchsperson[1])	rechts	links
1	49,6	51,0	1	44,5	42,6
2	37,85	37,78	2	47,0	44,5
3	50,9	51,4	3	57,3	50,8
4	48,2	47,5	4	49,3	48,4
5	56,2	52,3	5	41,2	40,7
6	48,0	50,8	6	49,2	47,9
			7	41,6	42,3
			8	51,1	51,2
			9	48,0	51,0

Das Ergebnis war bei den 6 Nicht-Bleiarbeitern 4 mal zahlennahe an 50, einmal bei einem schwächlichen Gummiarbeiter nahe an 38, einmal bei einem Former 56 an der rechten Hand. Die Differenzen zwischen rechts und links waren stets gering, bis auf den kräftigsten, bei dem die rechte Hand 56,15, die linke 52,3 zeigte; zweimal waren sie zugunsten der rechten Hand, einmal bestand nahezu Gleichheit (rechts 37,85, links 37,78), zweimal und außerdem bei dem Linkshänder (Nr. 6) bestand eine Differenz zugunsten der linken Hand. Bei den Bleiarbeitern schwankten die Zahlen in annähernd denselben Grenzen zwischen 40—57; zweimal unter den 9 Untersuchten bestand eine Differenz zugunsten der linken und zwar einmal um 3 bei Nr. 9, der eine Schußverletzung der rechten Schultergegend durchgemacht hat und angibt, sonst Rechtshänder zu sein (beim Essen, Schreiben) aber am Werktische links zu arbeiten, einmal waren beide Hände annähernd gleich, in einem Fall war die Differenz zwischen beiden Händen erheblich (57,28 rechts zu 50,82 links); sonst betrug die Differenz höchstens 2,5.

Die relativ häufigen hohen Werte der linken Hand sind bei Bleiarbeitern und Nicht-Bleiarbeitern auffallend, sind aber im allgemeinen nicht eine Folge der Linkshändigkeit, die nur in einem Falle wirklich vorlag, in einem angedeutet war; sie resultieren vielmehr wahrscheinlich aus der verschiedenartigen Technik und Ökonomik der Ausführung der Dynamometermessungen, der je nach der Hand bzw. Armstellung, ein ziemlich weiter Spielraum gelassen wird.

Erst 10—15 Minuten nach Beendigung der Dynamometeruntersuchung folgte die am Ergographen.

[1]) Kurven und sonstige Aufzeichnungen wurden stets unter dem Namen der betreffenden Person geführt. — Die Nummernbezeichnung wurde erst für Zwecke der Veröffentlichung, und zwar nach den Ergebnissen der Tab. 3 und 4, in Anwendung gebracht.

Die Überwindung all der oben erwähnten Schwierigkeiten hatte viel Zeit und Mühe gekostet. Immer wieder erkannten wir ohne Durchrechnung der Ergebnisse schon allein aus Betrachtung der arbeitenden Versuchspersonen, aus der Feststellung, daß noch weitere Arbeitskurven ohne Bewegung oder nennenswerte Bewegung im Handgelenk, sondern infolge Bewegung des ganzen Armes oder Körpers verzeichnet wurden, ferner durch Angaben der Versuchspersonen über Schmerzen (zu fester Verband), daß es uns noch nicht gelungen war, die Streckerwirkung für sich allein und ungestört zur Darstellung zu bringen. So verbrauchten wir eine Anzahl von hier nicht angeführten Versuchspersonen. Am 15. VII. 1925 hatten unsere Einrichtungen durch Anbringung der beiden Unterarmschienen jene oben beschriebene Vollendung erreicht, die uns richtige Resultate zu verbürgen schien. Die Ergebnisse an *allen von diesem Tage an benutzten Versuchspersonen sind den weiteren Ausführungen zugrunde gelegt* (und ebenso den obigen über Dynamometermessungen). Bemerkt sei, daß Bleiarbeiter und Nicht-Bleiarbeiter in wechselnder Reihenfolge untersucht wurden, wie sie eben zu den Versuchen kamen. Es wechselten — wenn auch nicht mit voller Regelmäßigkeit — Bleiarbeiter und Nicht-Bleiarbeiter. Die Untersuchungen fanden zwischen $^1/_2 5$ und 9 Uhr abends statt. Die Stereotypeure kamen zur Untersuchung *ehe* sie zur Arbeit gingen; die Bleilöter wurden $1^1/_2$ bis 5 Stunden nach Beendigung ihrer Arbeit untersucht, ebenso der eine erwähnte Gummiarbeiter; die übrigen Nicht-Bleiarbeiter waren arbeitslos.

Die Durchführung der Hebearbeit erfolgte im Takt des Metronoms (M. M. 90), auf dessen Einhaltung beim *Beginn* jedes Versuches durch taktmäßig wiederholtes: „jetzt", „jetzt", hingewirkt wurde. Bei einzelnen Personen war es notwendig, durch den Zuruf „Takt halten! langsamer" oder durch einige Male wiederholtes „jetzt", „jetzt" im Verlauf des Versuches auf Takthaltung hinzuwirken. Bei einzelnen Personen, bei denen sich Schwierigkeiten im Takthalten von Anfang an ergaben, wurde während des ganzen Versuches der Eindruck des Tick Tack des Metronoms durch gleichmäßig wiederholtes „jetzt", „jetzt" verstärkt, dabei aber strengstens vermieden, durch den wechselnden Ton des Wortes anfeuernd zu wirken. Während des Versuches wurde selbstverständlich auch jedes Gespräch zwischen uns beiden oder mit der Versuchsperson, nicht nur jede anfeuernde Bemerkung, sondern jede Bemerkung überhaupt unterlassen; es wurde nur vor Beginn der ersten Versuchsreihe die Versuchsperson darauf aufmerksam gemacht, daß sie ihr Bestes, möglichst viel leisten solle. Daß die vom Schreibhebel verzeichnete Kurve für die Versuchsperson unsichtbar war, ist schon erwähnt worden.

Als Ausgangspunkt für die Untersuchung diente stets jene Stellung, bei der die Hand in der geraden Verlängerung des Unterarmes sich

befindet; von dieser ausgehend wurden die Versuchspersonen angewiesen, durch Überextension entgegen der Schwere des Gewichtes dieses so weit zu heben als irgendmöglich war, dann der Schwere des Gewichtes allmählich nachzugeben. War die erwähnte Grundstellung erreicht, so stieß die Gewichtsführung an einen unelastischen Anschlag, wodurch in diesem Augenblick das Gewicht zu wirken aufhörte, die Schnur blieb gespannt. Dann wurde — immer nach dem Takt des Metronoms — neuerlich gehoben und die Versuchspersonen waren angewiesen, diese Bewegung so lange als möglich fortzusetzen. Man sah den Mienen der Leute gegen Ende jedes Einzelversuchs stets die starke Anstrengung an, bei manchen trat Rötung des Gesichtes, Schweißausbruch ein. Bei fast allen Versuchen ließen wir so lange arbeiten, bis der Mann von selbst aufhörte, bei einzelnen, bis er, nachdem schon mehrere ganz kleine 2 mm hohe Zacken geschrieben, ohne Bewegung im Handgelenk durch gewaltsamste Mitanstrengung anderer Muskeln, die die ganze Apparatur erschütterte, noch weiteres zu erreichen suchte. Die Arbeit wurde stets mit einem 5-Kilo-Gewicht begonnen; nachdem hierbei Erschöpfung eingetreten, wurde eine Pause von 2 Minuten gemacht, dann mit einem 4-Kilo-Gewicht bis zur Erschöpfung gearbeitet, nach abermaliger Pause von 2 Minuten mit einem 3-Kilo-Gewicht. Bei den Vorversuchen war auch ein 2-Kilo-Gewicht verwandt worden, doch zeigte sich, daß wir hiermit bei einzelnen Personen uns schon allzusehr der konstanten Phase näherten, deshalb wurden dann nur 5-, 4- und 3-Kilo-Gewichte verwandt. Nachdem so die Strecker der einen Hand geprüft waren, trat eine Erholungspause von mindestens 10 bis 15 Minuten ein, während der in der Regel die eine Hand eines anderen Arbeiters untersucht wurde. Dann kam die andere Hand des erstgenannten Arbeiters an die Reihe. Um den Fehler auszuschalten, der sich dadurch ergeben könnte, daß bei der Arbeit mit der zweiten Hand, sei es durch Ermüdung, sei es durch Übung, ihre Leistungsfähigkeit beeinflußt worden, wurde in der Weise vorgegangen, daß die Untersuchung jeder Versuchsperson am ersten Untersuchungstag mit der rechten Hand begonnen, dann erst die linke Hand geprüft wurde. Bei der am folgenden oder zweitfolgenden Tage vorgenommenen zweiten Untersuchung wurde zuerst die linke Hand untersucht, die am ersten Tage zu zweit untersucht worden war, dann erst die rechte. Nur in einem Falle (Bleiarbeiter Nr. 4) waren wir durch äußere Umstände gezwungen, alle Versuche, jedoch mit langer, ungefähr zweistündiger Pause an einem Tag vorzunehmen. Zu unseren späteren Berechnungen wurde dann auch die Summe der an jeder Hand an beiden Tagen erzielten Leistungen benutzt. Die auf dem berußten Papier (Schleife) registrierten Kurven wurden am Schlusse jeden Versuchstages in der gewöhnlichen Art durch Firnis fixiert und lieferten die Grundlage für

die weiteren Berechnungen. Berücksichtigt wurde bei unserer Berechnung dann: Hubzahl, Hubhöhe und Arbeitsleistung.

Leider ist es aus äußeren Gründen nicht möglich, die umfangreichen Tafeln, die über jeden einzelnen bei jedem Arbeiter unternommenen Versuch Aufschluß geben, hier zum Abdruck zu bringen; wir stellen sie jedoch gern auf Wunsch in Abschrift zur Verfügung. Wir müssen uns hier darauf beschränken als Beispiel für die Art unseres Vorgehens tabellarische Angaben über zwei Arbeiter zu bringen (Tab. 2).

Tabelle 2. Strecker.

	[1]	5 kg	4 kg	3 kg	Summe	[1]	5 kg	4 kg	8 kg	Summe
		Rechts					Links			
		Nichtbleiarbeiter Nr. 5.								
Hubzahl	I	66	59	60	185	II	50	31	50	131
	II	56	52	64	172	I	40	28	37	105
		122	111	124	357		90	59	87	236
Hubhöhe in cm	I	291,0	226,0	187,5	704,5	II	251,4	133,6	170,5	550,0
	II	319,1	220,3	246,2	785,6	I	196,0	91,6	103,7	391,3
		610,1	446,3	433,7	1590,1		447,4	225,2	273,7	946,3
Arbeitsleistung in mkg	I	14,55	9,04	5,63	29,22	II	12,57	5,34	5,10	23,01
	II	15,96	8,81	7,39	32,16	I	9,80	3,66	3,11	16,57
		30,51	17,85	13,02	61,38		22,37	9,00	8,21	39,58
		Bleiarbeiter Nr. 1.								
Hubzahl	I	33	13	18	64	II	45	18	43	106
	II	34	13	11	58	I	39	23	46	108
		67	26	29	122		84	41	89	214
Hubhöhe in cm	I	139,4	32,6	38,7	210,7	II	193,0	23,1	60,3	276,4
	II	103,0	34,9	24,2	162,1	I	187,5	47,9	88,1	323,5
		242,4	67,5	62,5	372,8		380,5	71,0	148,4	599,9
Arbeitsleistung in mkg	I	6,97	1,30	1,16	9,43	II	9,56	0,92	1,81	12,38
	II	5,15	1,40	0,73	7,28	I	9,38	1,92	2,64	13,94
		12,12	2,70	1,89	16,71		19,03	2,84	4,45	26,32

Ehe wir auf unser eigentliches Thema eingehen, sei folgendes vorausgeschickt:

Die Hubzahl war bei den ersten (mit frischen Kräften unternommenen) Versuchen mit 5 kg Belastung meist beträchtlich größer als beim darauffolgenden Versuch mit 4 kg Belastung, während bei 3 kg Belastung die Hubzahl meist stärker stieg, oft fast bis zur Höhe, in einzelnen Fällen über die Höhe der Hubzahl mit dem 5-kg-Gewicht. Eine

[1] Die römische Ziffer zeigt an, ob die betreffende Hand an dem Untersuchungstag als erste oder zweite zur Untersuchung gelangte.

bemerkenswerte Ausnahme machte ein sehr kräftiger Sportsmann, Metallarbeiter, mit starker Ehrgeizeinstellung, bei dem in 3 Versuchsreihen bei allmählich geringer werdender Belastung die Hubzahl erheblich stieg, bei der 4. Reihe (der 2. in der Versuchsanordnung) den geschilderten gewöhnlichen Verlauf zeigte.

Auch bei Betrachtung der Hubhöhe ergibt sich im allgemeinen, allerdings mit mehrfachen Ausnahmen, dasselbe Bild, daß mit Belastung von 4 kg eine geringere Hubhöhe erreicht wird als bei der mit 5 oder 3 kg. Der erwähnte Sportsmann zeigte dabei die gewöhnlichen Verhältnisse.

Die Arbeitsleistung, die ja eigentlich das allein maßgebende ist, zeigt mit einigen Ausnahmen ein starkes Sinken von der 5-kg- zur 4-kg-Leistung, während bei der folgenden Arbeit — 3 kg — dann meist wieder ein Steigen auftrat, dessen Endergebnis aber in der Regel weit unter der Arbeitsleistung bei 5 kg Belastung zurückbleibt.

Betrachten wir, wie weit die hintereinander folgende Untersuchung beider Hände (mit einer Pause von mindestens 10—15 Minuten) die Leistung der zweiten Hand beeinflußt, so gewinnt man nicht den Eindruck, als ob die Leistungsfähigkeit der als zweit zur Untersuchung kommenden Hand durch die vorangegangene Ermüdung der ersten wesentlich beeinflußt würde. Jedenfalls scheint diese Wirkung ganz zurückzutreten hinter der der Tagesdisposition und der Tagesermüdung; daß diese bei ergographischen Versuchen von großer Bedeutung, ist ja seit *Maggiora* bekannt. Die Untersuchungen fanden, wie erwähnt, stets abends statt und die Unterschiede zwischen den Untersuchungstagen sind auch bei den erwerbslosen Nicht-Bleiarbeitern sehr bedeutend.

Betrachten wir zunächst die *Nicht-Bleiarbeiter*, von denen 5 erwerbslose Metallarbeiter, einer ein in Arbeit stehender Gummiarbeiter war.

Vergleichen wir die Ergebnisse der einzelnen Versuche miteinander, in der Art, daß wir die 5-kg-Hebungen der rechten Hand eines Arbeiters an einem Tage mit der der linken an demselben Tage vergleichen, dann ebenso die 4-kg-Leistungen beider Hände desselben Arbeiters an demselben Tage usw., so finden wir bei den 5 Nicht-Bleiarbeitern Rechtshändern mit den zusammen 60 Einzelversuchen, also 30 Vergleichspaaren

25 mal die Hubzahl rechts größer als links, 5 mal links größer als rechts,
23 „ „ Hubhöhe „ „ „ „ 7 „ „ „ „ „
24 „ „ Arbeitsleistung „ „ „ „ 6 „ „ „ „ „

Addieren wir die an den beiden Tagen von derselben Hand mit demselben Gewicht vollbrachten Leistungen, um so den eventuell durch Beginn der Arbeit mit der einen Hand entstehenden Fehler auszuschalten, so ergeben sich 15 Vergleichspaare, bei diesen ist

15 mal die Hubzahl rechts größer als links,
14 „ „ Hubhöhe „ „ „ „ 1 mal links größer als rechts,
14 „ „ Arbeitsleistung „ „ „ „ 1 „ „ „ „ „

Eine *Sonderstellung* nimmt der Nicht-Bleiarbeiter ein, der *Linkshänder* ist; er zeigte: unter 6 Vergleichspaaren die Hubzahl nur 1 mal links größer als rechts, die Hubhöhe aber 3 mal links größer als rechts, die Arbeitsleistung ebenfalls 3 mal links größer als rechts. Unter 3 Vergleichspaaren (infolge Addition) ist die Hubzahl einmal links größer als rechts, die Hubhöhe 2 mal, die Arbeitsleistung ebenfalls 2 mal links größer als rechts. Das Gesamtresultat der Untersuchung bei Nicht-Bleiarbeitern ist in Tabelle 3 zusammengestellt. Wir sehen hier durchwegs bei den *Rechtshändern in Hubzahl, Hubhöhe und Arbeitsleistung die Leistung der rechten Hand die der linken wesentlich überragen*, allerdings in wesentlich verschieden hohem Maße. Setzen wir die Leistung der linken Hand = 100, so ist die Leistung, die diese Zahl am wenigsten überragt, unter den Hubzahlen 110, die am höchsten 151; in Hubhöhe sind diese Zahlen 116 und 189, in Arbeitsleistung 106,9 und 155. Bei

Tabelle 3. *Nicht-Bleiarbeiter.* (Strecker.)

Nummer der Versuchsperson	Rechts	Links	Bemerkungen	Proz.-Zahl links = 100 dann ist rechts
Nr. 1.				
Hubzahl	230	176	25 Jahre, Schlosser	130,9%
Hubhöhe (cm)	534,3	457,4		116,8%
Geleistete Arbeit (mkg) .	21,43	20,07		**106,9%**
Nr. 2.				
Hubzahl	255	232	31 Jahre, Gummiarbeiter	110%
Hubhöhe (cm)	508,5	424,6		119,0%
Geleistete Arbeit (mkg) .	19,42	16,26		**119,5%**
Nr. 3.				
Hubzahl	588	418	18 Jahre, Monteur, Ehrgeiz, Sportsmann, trägt links	140,5%
Hubhöhe (cm)	2142,7	1703,0		126%
Geleistete Arbeit (mkg) .	88,09	68,99		**128%**
Nr. 4.				
Hubzahl	353	257	33 Jahre, Former, schneidet links	137,2%
Hubhöhe (cm)	732,5	334,7		219%
Geleistete Arbeit (mkg) .	29,75	20,75		**143%**
Nr. 5.				
Hubzahl	357	236	36 Jahre, Former	151%
Hubhöhe (cm)	1590,1	946,3		168,1%
Geleistete Arbeit (mkg) .	61,38	39,50		**155%**
Linkshänder.				
Nr. 6.				
Hubzahl	232	216	44 Jahre, Lokomotivführer, schlapp! Linkser	107,5%
Hubhöhe (cm)	1149,9	1205,5		95,2%
Geleistete Arbeit (mkg) .	47,0	49,49		**95,01%**

dem Linkshänder ist zwar die Hubzahl rechts etwas höher (107,5), Hubhöhe und Arbeitsleistung aber rechts niedriger 95,2 bzw. 95%.

Betrachten wir nun die *Bleiarbeiter*, so haben wir hier 9 Versuchspersonen mit 108 Einzelversuchen und 54 Versuchspaaren. Davon war:

11 mal die Hubzahl rechts größer als links, 43 mal links größer als rechts,
10 „ „ „ „ „ „ „ 44 „ „ „ „ „
10 „ „ Arbeitsleistung „ „ „ „ 44 „ „ „ „ „

Unter den durch Addition gewonnenen 26 Vergleichspaaren war:

3 mal die Hubzahl rechts größer als links, 1 mal beiderseits gleich, 23 mal links größer als rechts,
4 mal die Hubhöhe rechts größer als links, 23 mal links größer als rechts,
4 „ „ Arbeitsleistung „ „ „ „ 23 „ „ „ „ „

Wir sehen hier bei Vergleich mit oben, daß sich die Verhältnisse von rechts und links nahezu umgekehrt haben, daß die *Leistungen der linken Hand die der rechten meist überragen und daß die Abweichungen von dieser Regel nur etwas häufiger sind als die Abweichungen von der bei Nicht-Bleiarbeitern gefundenen Regel.* Im Gesamtresultat (Tab. 4) sehen wir bei den Bleiarbeitern in einem Fall (Nr. 5) die Hubzahl rechts und links gleich, in einem anderen (Nr. 4) ganz minimal die rechte Hand die linke überragend (101,5%), bei allen anderen aber in Hubzahl und überall in Hubhöhe und Arbeitsleistung die linke Hand die rechte überragend. Beim Vergleich mit der linken beträgt die geringste Hubzahl der rechten Hand 57%, bei Hubhöhe schwankt die Leistung der rechten zwischen 62,2—91,4%, in der Arbeitsleistung zwischen 63,5% und 91,5% der Leistung der linken. Dabei ist bemerkenswert, daß der, der mit der Arbeitsleistung die geringste Differenz zugunsten der rechten zeigt (Nr. 9), angibt, zwar Rechtshänder zu sein, rechts zu schreiben und beim Essen rechts zu schneiden, aber am Werktisch links zu arbeiten. Er hat, wie wir erst nachträglich erfuhren und an den Narben feststellen konnten, eine Schußverletzung in der Gegend der rechten Schulter durchgemacht (Einschußnarbe über der Clavicula, Ausschußnarbe am vorderen Rand der Achselhöhle am Musculus pectoralis), während der ihm vorangehende (Nr. 8) angibt, Rechtshänder zu sein, aber links viel schwer zu heben; auf ihn entfallen von den bei Einzelversuchen insgesamt 31 Abweichungen zugunsten der rechten 6. Wir sehen *also bei den Bleiarbeitern das sonst bestehende Verhältnis der beiden Hände gerade umgekehrt,* die Streckerleistungen der linken Hand wesentlich höher als die der rechten. Die „jüngsten" unserer Bleiarbeiter (Nr. 5 und 7) waren seit ungefähr einem halben Jahr als Bleilöter beschäftigt, diejenigen, die am längsten als Löter tätig, waren es durch 5 bzw. $5^1/_2$ Jahre (Nr. 1 und 2); letztere zeigten auch klinisch deutlich Bleiwirkung (Kolorit, Streckerschwäche). Es ist wohl kein Zufall, daß diese beiden die Streckerschwäche am ausgesprochensten zeigten. Von den Stereotypeuren, die alle seit ihrem

Tabelle 4. *Bleiarbeiter* (Strecker).

Nummer der Versuchsperson	Rechts	Links	Bemerkungen	Proz.-Zahl: links = 100, dann ist rechts
Nr. 1.				
Hubzahl	122	214	22 Jahre alt, 5 Jahre Bleilöter,	57%
Hubhöhe (cm)	372,8	599,9	etwas Colorit, deutliche Str.	62,2%
Geleistete Arbeit (mkg) .	16,71	26,32		**63,5%**
Nr. 2.				
Hubzahl	233	298	31 Jahre, $5^{1}/_{2}$ Jahre Löter,	78,2%
Hubhöhe (cm)	715,6	1089,2	1924 bleikrank, Bleicolorit,	65,7%
Geleistete Arbeit (mkg) .	28,64	44,05	mäßige Str.	**65,01%**
Nr. 3.				
Hubzahl	246	342	25 Jahre, seit 11 Jahren Ste-	72%
Hubhöhe (cm)	1013,1	1430,7	reotypeur, 1923 magenkrank,	70,9%
Geleistete Arbeit (mkg) .	41,74	57,17	minimale Spur von Str.	**73,01%**
Nr. 4.				
Hubzahl	246	242	29 Jahre, 3 J. Löter, Sommer	101,5%
Hubhöhe (cm)	660,4	830,0	1924 Verstopfung. Keine Str.	79,6%
Geleistete Arbeit (mkg) .	26,50	35,38	Beide Versuche am selb. Tag.	**75,01%**
Nr. 5.				
Hubzahl	198	198	29 Jahre, $^{1}/_{2}$ Jahr Löter, An-	100%
Hubhöhe (cm)	527,1	685,8	deutung von Saum, etwas	77%
Geleistete Arbeit (mkg) .	22,39	30,41	Colorit, mittelstarke Str.	**74,3%**
Nr. 6.				
Hubzahl	190	228	48 J., Stereotypeur seit 32 Jah-	83,5%
Hubhöhe (cm)	695,5	892,6	ren, 1912 bleikrank, etwas	78%
Geleistete Arbeit (mkg) .	26,49	33,85	Colorit, mittelm. Str.	**78,3%**
Nr. 7.				
Hubzahl	158	175	28 Jahre, seit $6^{1}/_{2}$ Monaten	90,3%
Hubhöhe (cm)	574,8	644,4	Löter, Andeutung von Saum	89,3%
Geleistete Arbeit (mkg) .	22,42	26,02	und Colorit, etwas Str.	**86,3%**
Nr. 8.				
Hubzahl	173	214	30 Jahre, seit 16 Jahren Stereo-	81%
Hubhöhe (cm)	930	1019,0	typeur, 1922 Verstopfung,	91,4%
Geleistete Arbeit (mkg) .	38,57	42,45	sehr geringe Str.	**91%**
Nr. 9.				
Hubzahl	126	175	31 Jahre, seit 17 Jahren Stereo-	72%
Hubhöhe (cm)	1198,5	1346,4	typeur, minimale Str., Kriegs-	89%
Geleistete Arbeit (mkg) .	47,74	52,28	verletzung in rechter Schul-	**91,5%**
			tergegend, arbeitet am Werk-	
			tische stets links, schreibt	
			und schneidet b. Essen rechts.	

15. Lebensjahr im Beruf tätig waren, übte der jüngste den Beruf seit 11 Jahren aus (Nr. 3), der älteste seit 32 Jahren. Hier ließ sich keine genaue Übereinstimmung zwischen Zeichen von Bleieinwirkung oder anamnestischen Angaben über Erkrankung oder Angaben über subjektive Beschwerden und dem Grade des Überwiegens der linken Strecker feststellen.

Unter den Untersuchten fanden sich solche, die Zeichen von Bleieinwirkung darboten, und solche ohne derartige Zeichen. Der Grad der Streckerschwäche, der durch meine klinische Untersuchungsmethode festgestellt werden konnte, war bei dreien (Nr. 3, 8, 9) sehr gering, bei einem (Nr. 4) fehlte sie vollständig. Wir müssen daraus folgern, daß mit dem Ergographen sich noch Streckerschwäche feststellen läßt, wenn sie durch die klinische Untersuchung nicht mehr festgestellt werden kann, und daraus, daß wir keinen vollen Parallelismus zwischen klinischer und durch den Ergographen feststellbarer Streckerschwäche feststellen konnten — er ist aber insofern vorhanden, als die beiden mit größter ergographisch festgestellter Streckerschwäche auch klinisch deutlich Streckerschwäche zeigten, die mit der geringsten ergographisch feststellbaren Streckerschwäche auch klinisch nur eine sehr geringe Streckerschwäche — müssen wir schließen, daß die klinische Untersuchung uns kein *genaues* Maß über die Stärke der wirklich vorhandenen Streckerschwäche gibt. Der Umstand aber, daß wir auch bei Bleiarbeitern, die keinerlei objektive Zeichen der Bleieinwirkung boten (außer höchstens Streckerschwäche) und deren Anamnese auch keine oder nur sehr geringfügige Erscheinungen angibt (Nr. 3, 4, 8, 9) Streckerschwäche ergographisch feststellen konnten, beweist uns, daß auch bei langsamer und scheinbar symptomloser Wirkung des Bleies auf den Organismus es doch Veränderungen hervorruft, die zur Schwächung der Streckmuskeln führen. Um so mehr sind wir zu diesem Schlusse berechtigt, als die 9 von uns untersuchten Bleiarbeiter in keiner Weise ausgesuchtes Menschenmaterial sind. Warum nach der Aufbrauchtheorie es gerade die Strecker sind, die besonders häufig unter Bleiwirkung, aber auch unter Wirkung anderer Gifte leiden bzw. gelähmt werden, habe ich in meiner oben erwähnten Arbeit dargelegt: Die langen Strecker sind an sich sehr schwach angelegt, nach *Frohse-Fraenkel* (Bardelebens Handb. d. Anatomie 1908) beträgt, wenn die Gesamtmuskulatur des Armes = 100 ist, die Masse der Handstrecker 6,1, die der langen Fingerstrecker nur 3,3, was im Mißverhältnis zu ihrer bei aller handwerksmäßigen Arbeit starker Inanspruchnahme steht.

Von der, wie sich bei genauer Kenntnis der Literatur und genauer Überlegung erwies, nicht erfüllbaren Hoffnung ausgehend, durch ergographische Untersuchungen zu einem Vergleich der Strecker und Beuger kommen zu können, haben wir auch Versuche gemacht, die Stärke der Handbeuger zu prüfen. Es konnte hierzu dieselbe Apparatur benutzt werden, nur daß die vorher für die rechte Hand dienende Vorrichtung nun für die linke Hand verwandt werden mußte und umgekehrt; als Gewicht wandten wir $7^1/_2$, 7 und $6^1/_2$ kg an — sonst war

die Versuchanordnung die gleiche, doch fanden sich zu diesen weiteren Versuchen nicht alle Versuchspersonen ein.

Die Muskeln, die für die *Beugung der Hand* in Betracht kommen, sind: der Musc. Flexor carpi radialis, Musc. flexor carpi ulnaris, Musc. palmar. longus. Eine Mitarbeit des Musc. flexor digitorum sublimis oder profundus, der *Fingerbeuger*, ist, da die Versuche ja mit durch die Schienen gestreckten Fingern vorgenommen wurden, nicht anzunehmen, wenn auch vielleicht der Tonus dieser häufig mit den anderen gemeinsam arbeitenden Muskeln dabei etwas gesteigert wurde. Daß die Bewegung zu einer passiven Dehnung der Streckmuskeln führt, also nur gegen deren natürlichen Tonus ausgeführt werden kann, liegt auf der Hand. Erwähnt sei noch, daß nach den oben angeführten Untersuchungen von *Frohse-Fraenkel* die Masse der Handbeuger sehr gering ist (4,4), also auch geringer als die der Handstrecker allein und sehr viel geringer als die der langen Fingerbeuger (11,1).

Das Resultat ist nun, wenn wir die beiden Hände eines Arbeiters miteinander vergleichen, ein auf den ersten Blick höchst unerwartetes. Es erwies sich bei den *Nicht-Bleiarbeitern*, daß bei 3 Versuchspersonen mit zusammen 36 einzelnen Versuchen, also 18 Vergleichspaaren nur:

6 mal die Hubzahl rechts größer war als links, 2 mal beiderseits gleich und 10 mal links größer als rechts,
nur 5 mal die Hubhöhe rechts größer war als links, 13 mal links größer als rechts,
„ 5 mal die geleistete Arbeit rechts größer war als links, 13 mal links größer als rechts.

Führen wir wie oben die Addition der mit derselben Hand und demselben Gewicht vollbrachten Leistungen aus, so finden wir unter 9 Vergleichspaaren:

2 mal die Hubzahl	rechts größer als links,	6 mal	links größer als rechts,
4 „ „ Hubhöhe	„ „ „ „	5 „	„ „ „ „
4 „ „ Arbeitsleistung	„ „ „ „	5 „	„ „ „ „

In der Summe aller Leistungen (Tab. 5) ergibt sich, daß zunächst die Hubzahl überall rechts größer als links ist, die Hubhöhe aber und die geleistete Arbeit, also die für die Leistungsmessung wichtigsten Zahlen, *rechts kleiner sind als links*, und zwar bei 2 Arbeitern beträchtlich kleiner, während bei dem 3. der Unterschied relativ nur gering, wenn auch sehr deutlich ist. Auch muß erwähnt werden, daß der Letztgenannte links das Messer hält, ein anderer „links trägt". Aber sie sind sonst Rechtshänder und haben sich auch bei der Streckeruntersuchung als ausgesprochene Rechtshänder erwiesen. Haben wir es hier mit einer allgemeinen Regel zu tun? Sind bei dem Rechtshänder im allgemeinen diese Muskelgruppen rechts schwächer als links? Erklären

Tabelle 5. *Nichtbleiarbeiter* (Beuger).

Nummer der Versuchsperson	Rechts	Links	Prozentzahl: links = 100, dann ist rechts
Nr. 1.			
Hubzahl	127	168	186,9%
Hubhöhe (cm)	766,7	1 071,4	71,5%
Geleistete Arbeit (mkg)	54,78	77,53	70,6%
Nr. 3.			
Hubzahl	340	295	115,2%
Hubhöhe (cm)	1533,1	1811,8	84,3%
Geleistete Arbeit (mkg)	109,98	131,08	83,6%
Nr. 4.			
Hubzahl	209	233	89,6%
Hubhöhe (cm)	1346,8	1385,7	97,1%
Geleistete Arbeit (mkg)	97,21	99,23	98,1%

ließe es sich vielleicht daraus, daß dies Muskeln sind, die nur bei ganz besonderen Arbeiten geübt werden. Bei der gerade am meisten geübten Handbewegung, dem mehr oder minder vollen Faustschluß, der durch die Musc. flexor. digitor. sublimis und profundus (unter Mitwirkung der kleinen Handmuskeln) bei durch die Musc. extensores carpi ulnaris und radialis dorsalflektierter Hand durchgeführt wird, treten sie nicht in Tätigkeit und erfahren deswegen vielleicht nicht jenes Training und jene Ausbildung wie die anderen eben genannten Muskeln. Aber gerade bei der von uns vorgenommenen Prüfung haben sie den Tonus der Streckmuskulatur (einschließlich der Extensores digitorum) zu überwinden und sind deshalb vielleicht gerade an der rechten Hand mit ihren kräftigeren Extensoren geringere Wirkung zu entfalten imstande als an der linken Hand, deren Strecker sich als schwächer erwiesen haben als die der rechten.

Betrachten wir nun die *Bleiarbeiter*, so stehen uns 4 Personen mit 48 Einzelversuchen, 24 Versuchspaaren zur Verfügung. Wir wollen aber zunächst nur 3 Arbeiter mit zusammen 36 Einzelversuchen und 18 Versuchspaaren betrachten. Da erweist sich nun:

14 mal die Hubzahl rechts größer als links, 2 mal beiderseits gleich, 2 mal links größer als rechts,
14 mal die Hubhöhe rechts größer als links, 4 mal links größer als rechts,
14 „ „ geleistete Arbeit „ „ „ „ 4 „ „ „ „ „

Betrachten wir nun die durch Addition gewonnenen 9 Versuchspaare, so zeigt sich:

7 mal die Hubzahl rechts größer als links, 2 mal links größer als rechts,
8 „ „ Hubhöhe „ „ „ „ 1 „ „ „ „ „
8 „ „ geleistete Arbeit „ „ „ „ 1 „ „ „ „ „

Tabelle 6. *Bleiarbeiter* (Beuger).

Nummer der Versuchsperson	Rechts	Links	Prozentzahl: links = 100, dann ist rechts
Nr. 3.			
Hubzahl	220	193	114%
Hubhöhe (cm)	1090,2	756,3	144,2%
Geleistete Arbeit (mkg)	77,67	53,62	**144,9%**
Nr. 6.			
Hubzahl	212	181	117,1%
Hubhöhe (cm)	1449,6	1185,4	124,1%
Geleistete Arbeit (mkg)	101,89	83,71	**121,6%**
Nr. 7.			
Hubzahl	148	123	120,2%
Hubhöhe (cm)	915,9	795,1	108,2%
Geleistete Arbeit (mkg)	65,56	57,71	**138,8%**
Nr. 9.			
Hubzahl	112	103	108,8%
Hubhöhe (cm)	603,3	774,6	77,9%
Geleistete Arbeit (mkg)	42,42	54,28	**78,1%**

Betrachten wir die Gesamtresultate (Tab. 6), so sehen wir bei diesen Bleiarbeitern *stets Hubzahl, Hubhöhe und geleistete Arbeit rechts beträchtlich größer als links. Wir haben also hier gerade das umgekehrte Verhältnis wie bei den Nicht-Bleiarbeitern.* Diese Bleiarbeiter, die alle recht ausgesprochen das Überwiegen der linken Strecker über die rechten zeigten, zeigen nun das Überwiegen der rechten Handbeuger über die linken sehr deutlich, während bei dem normalen Rechtshänder das umgekehrte der Fall ist. So wie bei den Nicht-Bleiarbeitern der größeren Arbeitsleistung der rechten Strecker die geringere der rechten Handbeuger gegenüberstand, so steht bei den Bleiarbeitern der größeren Arbeitsleistung der linken Strecker die geringere der linken Beuger gegenüber. Dieser auch hier sich wiederholende Antagonismus spricht wohl für unsere oben ausgesprochene *Vermutung,* daß es die Notwendigkeit der *Überwindung des Tonus der beim Normalen rechts kräftigeren Strecker ist, die dazu führt, daß die äußere Arbeitsleistung der rechten Handbeuger geringer ist als die der linken,* während die geringere Kraft der beim Bleiarbeiter geschwächten rechten Strecker, die rechten Beuger bei ihrer Arbeitsleistung weniger behindert und sie deshalb stärker erscheinen läßt als die linken. Wir hätten es also auch hier mit einer, wenn auch indirekten Wirkung des Bleies, mit einer Folgeerscheinung der Streckerschwäche zu tun. Bestärkt wird diese Auffassung, die wir aber doch nur als Vermutung angesehen wünschen, durch das Verhalten des 4. in bezug auf die Stärke der Beuger untersuchten Bleiarbeiters. Er zeigt bei seinen 6 Versuchspaaren:

3 mal die Hubzahl rechts größer als links, 3 mal links größer als rechts;
1 mal die Hubhöhe rechts größer als links, 5 mal links größer als rechts;
1 mal die geleistete Arbeit rechts größer als links, 5 mal links größer als rechts. Insgesamt ist zwar die Hubzahl rechts größer als links, Hubhöhe und geleistete Arbeit aber links sehr beträchtlich größer als rechts. Dieser Arbeiter aber ist jener, der eine Schußverletzung rechts hatte, der angibt, am Werktisch links zu arbeiten und der in der Reihe der Bleiarbeiter bei der Streckerprüfung derjenige ist, bei dem in bezug auf die Arbeitsleistung die geringste Differenz zugunsten der linken Hand besteht.

Tabelle 7. *Arbeitsleistung der Beuger.*
(Arbeitsleistung der Strecker = 1 gesetzt.)

Nummer der Versuchsperson	Rechts	Links	Nummer der Versuchsperson	Rechts	Links
	Nichtbleiarbeiter.			*Bleiarbeiter.*	
1	2,56	3,88	3	1,86	0.94
3	1,25	1,9	6	3,84	2,46
4	3,27	4,77	7	2,93	2,22
			9	0,88	1,03

Wir haben oben gesagt, daß die Resultate der auf unsere Art gewonnenen Arbeitsleistung den Vergleich verschiedener Muskelgruppen eigentlich nicht gestatten, weil wir nicht wissen, wie sich die angewandten Gewichte zum Endmaximalgewicht verhalten. Wir wollen deshalb das Folgende nur mit allem *noch weitergehenden Vorbehalt* als das eben Gesagte ausführen. Vergleichen wir Strecker und Beuger miteinander (Tab. 7), so scheinen bei den Nicht-Bleiarbeitern die *Beuger der linken Hand die Strecker derselben Hand beträchtlich mehr zu überragen*, als dies an der rechten Hand der Fall ist, während bei den 3 erstangeführten *Bleiarbeitern das Umgekehrte der Fall ist* —, was ja zu erwarten war, da wir festgestellt haben, daß bei den Nicht-Bleiarbeitern die Strecker rechts stärker als links, die Beuger rechts schwächer als links sind und bei den Bleiarbeitern das Umgekehrte der Fall ist. Bei dem 4. Bleiarbeiter besteht eine annähernde Gleichheit der Beuger- und Streckerleistung, links überragen etwas die Beuger, rechts die Strecker.

All dieses spricht wohl dafür, daß die bei Nicht-Bleiarbeitern bestehende geringere Arbeitsleistung der rechten Handbeuger auf die überhaupt und auch bei dem Versuch bestehende antagonistische Wirkung der Strecker, die rechts stärker als links sind, zurückzuführen ist. Da bei den Bleiarbeitern die Strecker rechts schwächer sind, so tritt die entgegengesetzte Erscheinung zutage, die Arbeitsleistung der rechten

Beuger ist größer als die der linken. All dies aber soll hier nur mit allem Vorbehalt vorgebracht werden, als ein Erklärungsversuch für das eigenartige Verhalten der Beuger der Hand bei unseren Untersuchungen, das darnach in vollkommen guten Einklang mit unseren Feststellungen an den Streckern zu bringen ist und diese bestätigt. Ehe wir aber über diese komplizierten Verhältnisse etwas mit Sicherheit sagen können, müßten weit mehr Vorarbeiten auf dem Gebiet der Muskelphysiologie geleistet sein, als dies heute der Fall ist.

Viel einfacher aber liegen die Verhältnisse bei der Messung der Arbeitsleistung der Strecker, von der ja unsere Untersuchungen ausgegangen sind. Es ist gewiß zuzugeben, daß unsere Zahlen selbst nicht ganz ziffernmäßig genau sind, das aber geht wohl aus unseren Untersuchungen *mit Sicherheit hervor: das Vorhandensein einer „Streckerschwäche" bei Bleiarbeitern, auch wenn diese sonst keinerlei Zeichen von Bleiwirkung darbieten,* und zwar — da wir sie bei allen unseren nicht ausgewählten Fällen finden — jedenfalls in sehr großer Häufigkeit.

Eine Untersuchung des Verhältnisses von Streckern zu Beugern bei Bleiarbeitern und Nichtbleiarbeitern ist in großem Maßstabe von *Glibert,* dem ärztlichen Chef der belgischen Gewerbeaufsicht durchgeführt und im Bulletin de l'Académie Royale de Médécine 1903 veröffentlicht worden. Sie sei hier der Vollständigkeit halber und weil das Original deutschen Lesern ja kaum zugänglich ist, auszugsweise wiedergegeben. *Glibert* hat mittels eines eigenartig konstruierten Dynamometers die Stärke der Strecker, mittels eines gewöhnlichen die der Beuger gemessen. Darauf, daß das gewöhnliche Dynamometer nicht allein von der Stärke der langen Beuger der Finger beeinflußt wird, sei kurz hingewiesen; — unsere Ergographenmessungen erstreckten sich nur auf die Beuger der *Hand.* Dem zur Messung der Kraft der Strecker angegebenen Dynamometer haften nach der Photographie, die mir Herr *Glibert* freundlichst zur Verfügung gestellt, gewisse Mängel an. Die Arbeitsverhältnisse der langen Strecker sind hierbei sehr ungünstig, denn sie strecken die Finger im Grundgelenk; da aber die Platte des Apparates an der Streckseite des Endgliedes und zum Teil auch des Mittelgliedes sitzt, so wirkt die der Streckung Widerstand leistende Feder an einem sehr langen Hebelarm. Auch muß dabei notwendigerweise auch eine Streckung im Mittelgelenk durchgeführt werden, die von den kleinen Handmuskeln ausgeführt wird. All diese Umstände erklären es auch, warum die Verhältniszahlen zwischen Beugern und Streckern, zu denen *Glibert* mittels seiner Dynamometermessungen kommt, ganz andere sind als die, zu denen wir mittels Ergographenmessungen gekommen sind. Seine Zahlen für Nichtbleiarbeiter wären nach unserer Berechnungsart 12,45 für die rechte, 11,89 für die linke Hand. Er stellt die Verhältnisberechnung etwas anders an; die Verhältniszahl $x = \frac{100 \text{ Strecker}}{\text{Beuger}}$ und kommt zu folgenden Resultaten: Diese Verhältniszahl ist bei:

	rechts	links
1000 Nichtbleiarbeitern	8,0	8,4
bei 68 Bleiarbeitern mit Bleisaum, aber ohne jede gegenwärtigen oder früheren Krankheitserscheinungen	7,5	8,2
7 einmal erkrankt gewesene Bleiarbeiter gegenwärtig mit Bleisaum	6,6	7,7
2 früher gelähmt gewesene Bleiarbeiter	6,0	7,1

Auffallenderweise erscheinen hier auch bei den Nichtbleiarbeitern die Strecker der rechten Hand etwas ungünstiger als die der linken im Vergleich zu der Beugemuskulatur der Finger (nicht der Hand!), aber diese ungünstige Stellung *der rechten Strecker tritt stärker hervor bei Bleiarbeitern* und noch stärker bei früher erkrankt gewesenen Bleiarbeitern.

Hinzugefügt sei übrigens, daß *Glibert* selbst die Apparatur, die er 1903 anwendete, nicht befriedigend fand. Er hat andere Apparate konstruiert und deren Abbildung in den Akten des 1. Internationalen Kongresses für Gewerbekrankheiten in Mailand 1906 veröffentlicht. Untersuchungen mit dieser Apparatur liegen uns bisher nicht vor.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. — Direktor: Geh. Hofrat Prof. Dr. *M. Hahn*; Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. *Bruno Heymann*.)

Infektionsversuche mit einzelnen Pneumokokken.

Von

László Wámoscher,

Vol.-Assistent am Institut.

Mit 4 Textabbildungen.

Es war mit den bisherigen Methoden der Bakteriologie noch nicht mit voller Sicherheit gelungen serienweise Ein-Zell-Kulturen herzustellen; Tiere mit einem *einzigen* Keim zu infizieren, war vollkommen unmöglich. Weder die zur Zeit in den meisten Brauereien übliche Technik zur Einzelisolierung von Hefezellen nach *Lindner*, noch mit Hilfe der *Burri*schen Methode gelingt es in einfacher, schneller und vollkommen zuverlässiger Weise Serienversuche durchzuführen.

Es lag außerdem nicht in der Hand des Untersuchers ein *bestimmtes* Bakterium aus der Kultur oder aus Krankheitsprodukten (Blut, Eiter, Sputum, Faeces usw.) zu isolieren, sondern man war gewissermaßen dem Zufall preisgegeben. Es war als günstig zu bezeichnen, wenn man unter sehr vielen Tropfen einer stark verdünnten Kulturlösung oder Bakterienaufschwemmung *einen* fand, in dem nur *ein* Bakterium enthalten war. Absolute Sicherheit darüber, daß dies tatsächlich der Fall ist, war übrigens nicht oder nur sehr schwer zu erlangen (ohne Färbung, die aber nicht in Frage kommen kann), wenigstens dann, wenn es sich um sehr kleine und das Licht nur wenig brechende Bakterien handelte. Nur das Tusche-Verfahren war in dieser einen Beziehung zufriedenstellend, doch ging es dabei — es liegt dies in der Technik selbst — nicht ohne eventuell die Bakterien schädigende Momente, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, ab.

Die Bierbrauereien stellen sich heute im allgemeinen ihre Ein-Zell-Kulturen folgendermaßen her: Die verunreinigte Hefeaufschwemmung wird empirisch sehr stark mit Bierwürze verdünnt und auf ein Deckglas werden mit einer gewöhnlichen Zeichenfeder daraus kleine Tröpfchen gesetzt, auf einen hohlgeschliffenen Objektträger getan und mikroskopisch bei stark verengter Irisblende oder gesenktem Kondensor

jeder Tropfen durchgemustert. Jene Tröpfchen, die tatsächlich nur *eine* Hefezelle enthalten, werden bezeichnet. Nach 24—48 stündigem bzw. längerem Brutschrankaufenthalt werden die bezeichneten Tropfen auf Wachstum geprüft und aus diesen Tröpfchen weitergeimpft. Verunreinigende Bakterien sind durch diese Methode direkt nicht zu beseitigen; sie wachsen selbstverständlich meistens mit der Hefezelle weiter und werden erst später durch die bekannte Säurebehandlung „natürlich gereinigt“.

Dies Verfahren ist trotz seiner Schwierigkeiten, was Zeit und die dabei möglicherweise entstehenden Gefahren (z. B. Austrocknung bei nicht genügend schneller Arbeit) anbetrifft, wenn auch mühevoll und langsam, so doch durchführbar bei Hefezellen, die relativ groß und stark lichtbrechend sind und dadurch auch bei mittelstarken Vergrößerungen im abgeblendeten Hellfeld zu erkennen sind.

Bei kleineren und im Hellfeld weniger gut oder gar nicht sichtbaren Bakterien waren diese und ähnliche Methoden unbrauchbar.

Bisher war es überhaupt nicht gelungen eine Methode auszuarbeiten, die es ermöglicht hätte, serienweise Laboratoriumstiere mit einem einzigen Keim oder mit einer bestimmten kleinen Anzahl von Keimen sicher zu infizieren.

Es braucht wohl nicht betont zu werden, welche große und vielseitige Bedeutung die beiden obigen Probleme haben. Es sei nur an einige Fragen erinnert: Von größtem Interesse ist die Feststellung, wieviel Prozent Keime einer Kultur, oder von im Blute, Sputum, Faeces usw. sich befindenden Bakterien nötig sind, um einerseits eine Kultur zu ermöglichen, andererseits um in tierischen Organismen die ihnen spezifische Krankheit hervorzurufen. Die Virulenz einer bestimmten Reinkultur ist mit Hilfe eines Verfahrens, das uns in die Lage setzt, Tiere mit einer bestimmten Anzahl von Keimen zu infizieren, einfach mit Zahlen auszudrücken. Die Frage der sog. Disposition zu Infektionskrankheiten wird hierdurch sicherlich wenigstens in dieser einen Beziehung exakter angegriffen werden können. Mutationsstudien wären leichter durchführbar. Außerdem wäre es in vielen technologischen Betrieben, die mit Bakterien arbeiten, sehr erwünscht, in kurzer Zeit zuverlässig Reinkulturen aus einem Bakteriengemisch herzustellen. Hauptsächlich kommen die gärungstechnischen Industriebetriebe in Betracht. In unserem Institute sind auf Veranlassung von Geheimrat *M. Hahn* Versuche durchgeführt worden, die eine schnelle und sichere Methode zur Hefe-Ein-Zell-Kultur ergaben. Diese Beispiele ließen sich fast bis ins Unendliche vermehren, doch möchten wir nur noch ein einziges anführen, über welches ebenfalls auf Veranlassung von Herrn Geheimrat *Hahn* Versuche bereits im Gange sind, nämlich eine neue exakte Methodik zur Opsoninbestimmung.

Wir haben heute eine elegante, absolut sichere Methode sowohl um serienweise Ein-Zell-Kulturen anzulegen, als auch um Tiere mit einer gewünschten Anzahl von Bakterien zu infizieren. Es ist dies die von Professor *Tibor Péterfi* angegebene und in allen Einzelheiten sorgfältig ausgearbeitete Methode, die auf die Benutzung des von *Péterfi* konstruierten Mikromanipulators und seiner Nebenapparate beruht. *Péterfi* und *Wámoscher* haben die Methodik kurz in der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten Bd. 106, H. 1, S. 191 beschrieben; auf diese Arbeit sei ein für allemal hingewiesen.

Im Gegensatz zu den alten Methoden, die wir schlechthin als Verdünnungsmethoden bezeichnen müssen, ist die *Péterfi*sche Methode eine bewußte und vollständig kontrollierbare direkte Auslese von Einzelkeimen, und zwar von durch den Untersucher *auswählbaren* Einzelkeimen.

Der *Péterfi*sche Mikromanipulator ist, was seine mechanische Konstruktion, seine allgemeine Bedienungsart und die meisten dazugehörenden Nebenapparate und Instrumente betrifft, von *Péterfi* selbst im Handbuch der biol. Arbeitsmethoden von *Abderhalden*, Abt. V, Teil II, S. 479—516, und im *Kraus-Uhlenhuth*schen Handbuch der mikrobiologischen Technik Bd. III, S. 2471—2488 schon beschrieben.

Eine Verbesserung von allergrößter Wichtigkeit erfuhr die *Péterfi*sche Methodik durch die Konstruktion der sog. Präparier-Wechselkondensoren (kurz P.-W.-Kondensoren), die es ermöglichen Mikromanipulationen im *Dunkelfeld* vornehmen zu können. *Péterfi* beschrieb diese Kondensoren in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie (im Druck).

Durch Verwendung dieser Kondensoren wurden wir in die Lage versetzt, ohne Schwierigkeit an Objekte heranzugehen, die bisher der mikrurgischen Behandlung im Hellfeld unzugänglich waren.

Ich hatte den großen Vorzug, von Prof. *Péterfi* selbst die ersten Anleitungen zur Arbeit mit seinem Mikromanipulator zu erhalten, und habe mit dieser Methode im Rahmen anderer Arbeiten über Pneumokokken, weiße Mäuse mit einzelnen Pneumokokken infiziert, außerdem Ein-Zell-Kulturen angelegt und das Wachstum der einzelnen Zelle kontinuierlich beobachtet. Bevor ich auf die einzelnen Ergebnisse dieser Untersuchungen eingehe, möchte ich die angewandte Methodik in aller Ausführlichkeit, ihre Leistungsfähigkeit, Fehlerquellen und die Herstellung der zur Manipulation nötigen Instrumente besprechen, trotzdem schon manches, was ich hier in extenso ausführen werde, in der zusammen mit Professor *Péterfi* publizierten Arbeit dargelegt ist.

Es mag vielleicht unnütz erscheinen, daß auf kleinste Kleinigkeiten bei dieser Beschreibung so großes Gewicht gelegt wird, jedoch ist bei

der subtilen Methodik manchmal der geringste technische Fehler von großem Nachteil.

Die Pneumokokken stellen, was ihre Größe, Form und optische Beschaffenheit (Lichtbrechungsvermögen) anbetrifft, ein ziemlich schwieriges Arbeitsobjekt dar. Es spricht für die Güte der Methode, daß die Arbeit mit Pneumokokken immer noch verhältnismäßig leicht und dabei mit absoluter Sicherheit vor sich ging.

Die Isolierung einzelner Pneumokokken wurde mit *Mikropipetten* durchgeführt. Sie wurden folgendermaßen hergestellt: aus möglichst dünnwandigem Glasrohr werden 0,75—1,2 mm dicke Capillaren ausgezogen und in 15—20 cm lange Stücke zerteilt. Eine solche Capillare wird zwischen Daumen und Zeigefinger beider Hände so gefaßt, daß das zwischen beiden Händen liegende Capillarstück ca. 2 cm lang ist. Dabei stemmen sich die übrigen Finger gegen die der anderen Hand. So hält man die Capillare über die Mikroflamme und zieht sie, sobald das Glas weich wird (nicht vorher ziehen!!), indem man sie gleichzeitig höher hebt, etwas aus; nun wird wieder gesenkt und wie oben verfahren, so lange, bis die Mündung der eben ausgezogenen Capillare nunmehr etwa nur noch 3—5 μ dick ist. Je länger (selbstverständlich auch nur zwischen bestimmten Grenzen und zwar zwischen 0,3—0,6 cm) das durch den ersten Zug verfertigte schon sehr dünne Stück der Capillare ist, desto besser wird man damit arbeiten können, da die optischen Verhältnisse dadurch günstige werden (Überstrahlung durch das Glas im Dunkelfeld geringer). Durch kurze Übung wird man den oben bezeichneten Zeitpunkt, in dem die Capillare nur noch 3—6 μ dick ist, bald herausfinden. Auf jeden Fall ist die Capillare makroskopisch kaum mehr zu sehen. Nun wird hoch über der Flamme, d. h. „kalt“ durch leichten Zug die Capillare zerrissen. Sie muß nun nur noch nach oben gebogen werden. Die Dimensionen der feuchten Kammer[1]), in der die Isolierung vor sich geht, bestimmen die Länge des umzubiegenden Endstückes: es darf nämlich nicht mehr wie 2,5 mm betragen. Diese Umbiegung geschieht folgendermaßen: die Mikropipette wird mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand gefaßt und so über die Mikroflamme gehalten, daß die Verlängerung des Flammenkegels die Mikropipette ca. 3 mm vor dem ausgezogenen feinen Ende senkrecht schneiden würde. Durch vorsichtiges Senken der Mikropipette gegen die Flamme kommt man in einer bestimmten Höhe über derselben in den durch die aufwärts strömende erwärmte Luft erzeugten Strom, der das umzubiegende Ende der Pipette nach oben weht. Der Umbiegungswinkel soll möglichst 90° betragen, aber auch 70—80° genügen. Es soll aber eine Überbiegung über 90° aus optischen Gründen unbedingt vermieden werden. Es ist wohl unnötig zu erwähnen,

[1]) Wir benutzten die niedrige Feuchtkammer, vgl. *Péterfi-Wámoscher* a. a. O.

daß die Wand der Mikropipette, insbesondere die ihrer Mündung, möglichst dünn sein soll. Nachdem man sich unter dem Mikroskop überzeugt hat, daß das Lumen der Mündung die gewünschte Größe hat (300fache Vergrößerung anwenden) und daß die Mündung so nach oben gerichtet ist, daß die ganze Zirkumferenz des Mündungsrandes in *einer* optischen Ebene liegt, wird die nunmehr fertige „Mikrokanüle" mit Deckglaskitt in die *Péterfi*sche elektrische Heizpipette luftdicht angeschlossen und bei schwacher und starker Vergrößerung nach Anbringen an der Instrumentenklammer des Mikromanipulators, zentriert. Die Öffnung der Pipette muß selbstverständlich wagerecht, in der optischen Ebene liegen.

Über die Dimensionen und Feuchthaltung der Feuchtkammer, sowie über die Anleitung zur Säuberung der Deckgläser ist alles aus der oben zitierten Arbeit von *Péterfi* und *Wámoscher* zu entnehmen.

Die zentrierte Mikropipette wird nun so weit wie möglich gegen den Boden der Feuchtkammer gesenkt; unter mikroskopischer Kontrolle überzeugt man sich davon, daß die Pipette frei beweglich ist, am besten dadurch, daß man sie mit der Sagittalschraube hin und her bewegt.

Auf ein sorgfältig gereinigtes, zu der Feuchtkammer passendes Deckglas wird in der Mitte ein Tropfen steriler Nährlösung (siehe weiter unten) gesetzt und in einiger Entfernung ein Kulturtropfen oder Blut, Sputum usw. Beide Tropfen müssen *etwas* ausgebreitet werden, um nicht allzu kugelig zu sein (sonst enorme Überstrahlung im Dunkelfeld).

Die Mündung der Mikropipette muß so tief liegen, daß sie nun weder das auf die Feuchtkammer gesetzte Deckglas, noch die daran hängenden Tropfen berührt. Außerdem muß der Stiel der Pipette wagerecht liegen, so daß er auch bei Bewegungen der ganzen feuchten Kammer mit den Kreuztischschrauben das Deckglas nicht berührt[1]).

Der Rand des Nährlösungtropfens wird zunächst bei schwacher Vergrößerung[2]) (150—200fach) im abgeblendeten Hellfeld zentriert, dann geht man durch Einschalten der Dunkelfeldzentralblende und richtige Stellung des Planspiegels auf Dunkelfeld über und hebt mit der Vertikalschraube die Pipettenmündung in den Rand dieses Tropfens hinein, um sie damit zu füllen. Berührt die Pipettenmündung den Tropfen, so saugt sie sofort Flüssigkeit an, was man im Dunkelfeld sehr gut an dem Heranströmen von stark leuchtenden Ultrateilchen beobachten kann. Ist die Pipette genügend gefüllt ($^1/_2$—$1^1/_2$ Minuten, je nach der Größe der Mündung und je nach der Viscosität der einzusaugenden Flüssigkeit), so senkt man sie und stellt durch Verschiebung

[1]) Weitere Einzelheiten siehe *Péterfi* und *Wámoscher* a. a. O.

[2]) Über die zu verwendenden Objektive vgl. ebenfalls *Péterfi* und *Wámoscher* a. a. O.

der im Zeißschen Objektführer angebrachten feuchten Kammer den Rand jenes Tropfens ein, aus dem man einen bestimmten Pneumokokkus isolieren will. Ich habe sowohl aus einer Nährlösung, wie aus Mäuseblut, das mit etwas Natriumcitrat versetzt worden war, aus metapneumonischen Empyemeiter, aus Peritoneal- und Pleuraexsudat Pneumokokken isoliert.

Nachdem man sich den zu isolierenden oder die zu isolierenden Keime, die möglichst nahe dem Tropfenrand liegen sollen (aber nicht müssen) bei starker Vergrößerung (bis 1200fach) ausgewählt hat, stellt man die Mündung der Pipette so unter diesen Keim, oder diese Keime ein, daß bei Eintauchen der Pipettenmündung in den Tropfen obige Keime der Capillarsaugwirkung am ehesten ausgesetzt sind. Bruchteile einer

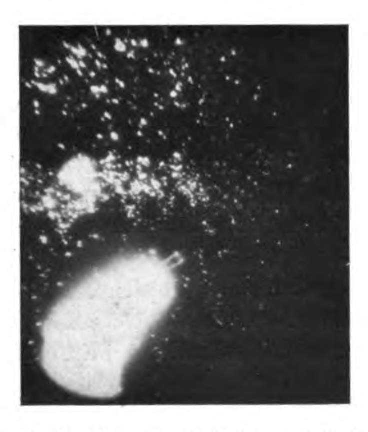


Abb. 1. Die als weiße Pünktchen und Flecke erscheinenden Gebilde sind die in Bouillon stets vorhandenen Ultrateilchen und nicht filtrierbare Partikelchen. (Dunkelfeldaufnahme Vergr. 700 fach.)

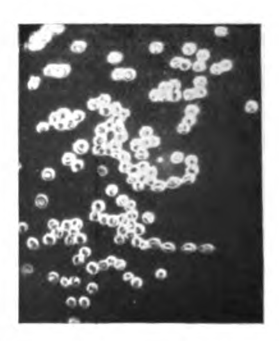


Abb. 2a. Blut einer an Pneumokokkensepsis gestorbenen Maus. Dunkelfeldaufnahme. Vergr. Zeiss Apochr. 4 mm Phoku (250 fach).

Sekunde dauert es nur, bis nach Eintauchen der Mündung der oder die Keime in die Pipette gesogen werden. *Sehr schnell* muß nun die Pipette aus dem Tropfen gesenkt werden, denn hiervon hängt am meisten das sofortige Gelingen der Isolierung ab. Führt man die Pipettenmündung zu langsam nach unten aus dem Tropfen hinaus, so werden immer außer den gewünschten Keimen noch andere in die Pipette eingesogen werden. Um sich nun zu vergewissern, daß die Pipettierung des gewünschten oder der gewünschten Keime gelungen ist, bläst man auf eine trockene Stelle des Deckglases einen Tropfen mit der elektrischen Heizpipette aus (s. Originalarbeiten von *Péterfi* l. c.). Der ausgeblasene Tropfen soll nicht größer sein als das bei mittlerer Vergrößerung sich einstellende Sehfeld. *Gleich* nach dem Ausblasen wird man bei stärkster Vergrößerung den Tropfen im Dunkelfeld nur schwer durchmustern können wegen der enormen Überstrahlung des vom Tropfenrand ausgehenden blendenden Lichtes,

doch wird bei sauberen Deckgläsern die Wölbung des Tropfens nach einigen Sekunden schon weit geringer und die Überstrahlung nicht mehr allzu stark stören. Mit einer gewissen schiefen Spiegelstellung und

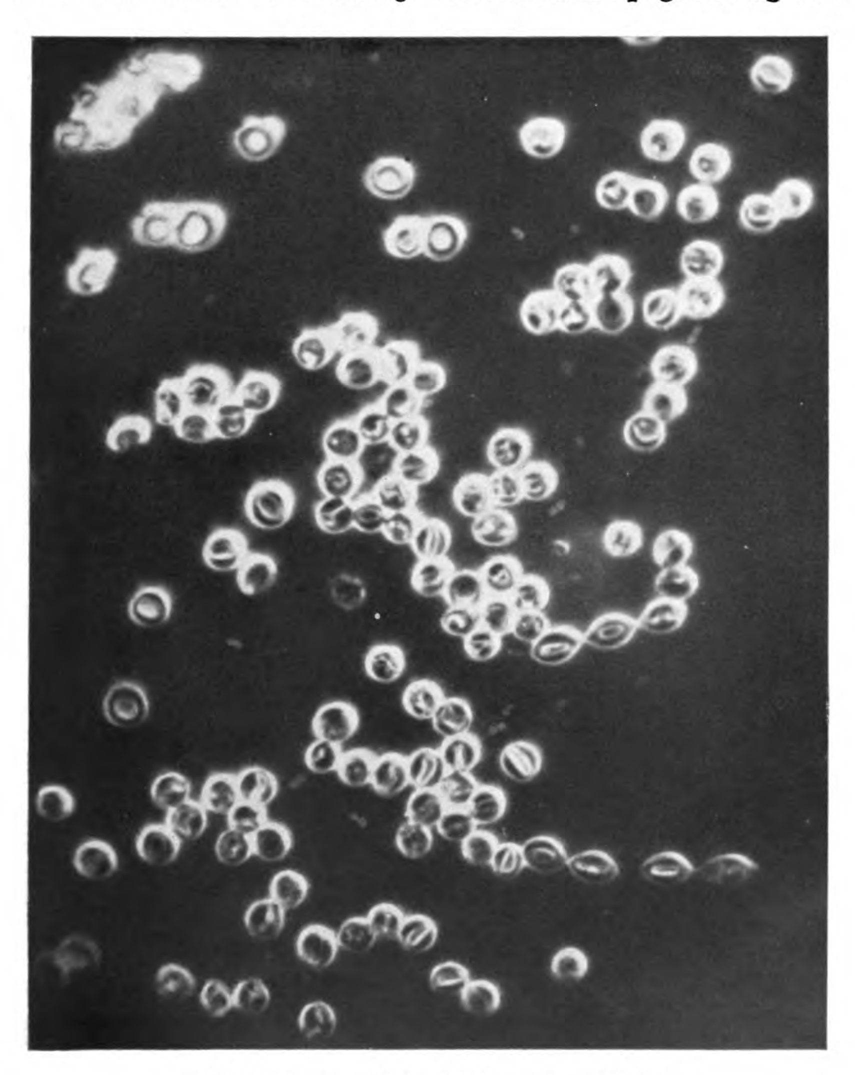


Abb. 2b. Photographische Vergrößerung von Abb. 2a.

dadurch Änderung des Azimuts wird man die Störung durch diese Randstrahlen noch weiter verringern können.

Hat man neben dem gewünschten oder den gewünschten Pneumokokken noch andere eingesogen und nunmehr in den Tropfen ausge-

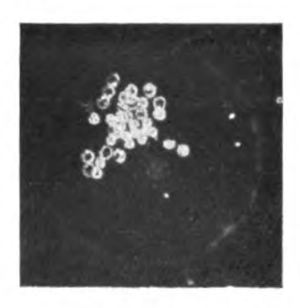


Abb. 3a. Erster isolierter Tropfen. Dunkelfeldaufnahme. Vergr. Zeiss Apochr. 4 mm Phoku (250 fach).

blasen, ferner, hat man den Verdacht, daß sich in der Pipette außer den im ersten Tropfen ausgeblasenen Pneumokokken sich noch andere befinden können, so bläst man so lange solche kleine Tröpfchen aus, bis in den letzten zwei Tropfen sich keine Keime mehr befinden. (Das letztere muß man in jedem Fall tun.) Durch abermaliges Ansaugen des oder der gewünschten Keime und abermaliges Ausblasen zur Vergewisserung, hat man nun in einem Tropfen das Gewünschte. Die Abbildung 1 (S. 426) zeigt

Abb. 3b. Photographische Vergrößerung von Abb. 3a.

die mikrophotographische Aufnahme (alle Mikrophotogramme wurden mit dem *Zeiss schen Phoku* gemacht) eines sterilen Nährlösungstropfens mit eingeführter Pipette, die zur Sichtbarmachung des Endteiles etwas an die Deckglasoberfläche gedrückt worden ist.



Abb. 4a. Der einzelne Pneumokokkus befindet sich unterhalb der Gruppe der 3 Erythrocyten. Dunkelfeldaufnahme. Vergr. Zeiss Apochr. 4 mm Phoku (250 fach).

Die direkte Isolierung aus Blut illustrieren die Bilder 2—4 (S. 426—429). Wie schon erwähnt, wurde zu einer 3,4 proz. Natriumcitratlösung Herzblut einer an Pneumokokkensepsis gestorbenen Maus zugesetzt und daraus ein einzelner Diplokokkus isoliert.

Die bei der Isolierung im ersten Tropfen, der mit Absicht groß und viele geformte Bestandteile enthaltend gewählt worden ist, mit angesaugten Erythrocyten schaden selbstverständlich gar nichts (Abb. 3a

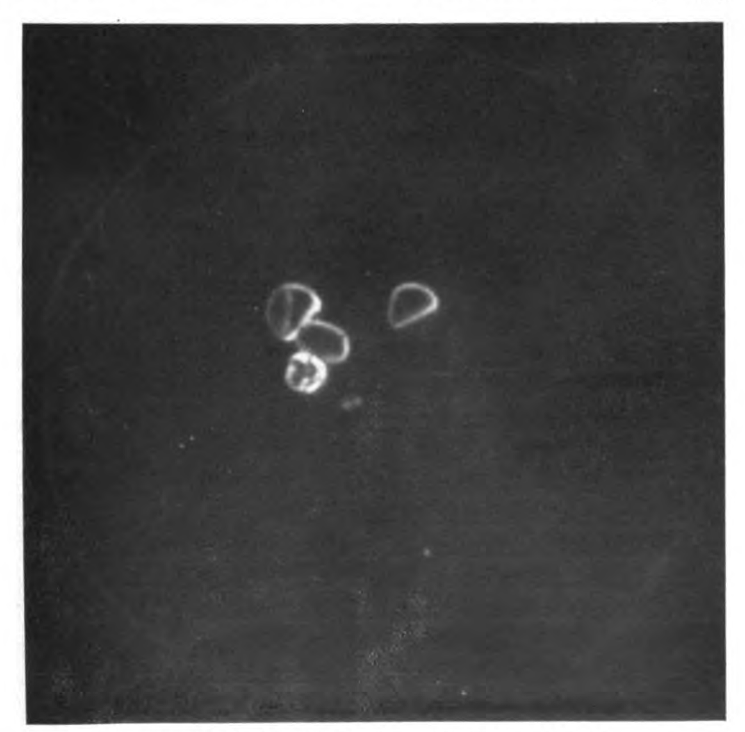


Abb. 4b. Photographische Vergrößerung von Abb. 4a.

und b). Der zweite isolierte Tropfen enthält nunmehr neben vier Erythrocyten nur noch *einen* Diplokokkus (Abb. 4a u. b).

Man braucht also, um aus tierischen Produkten mit einem einzigen oder mit einer gewünschten kleinen Anzahl von Keimen weitere Passagen

ausführen zu können, nicht eine Kultur abzuwarten, sondern man kann *direkt* aus dem Blut usw. des verendeten Tieres sowohl ein anderes infizieren, als auch Ein-Zell-Kulturen anlegen. Dieser letztere Umstand kann eventuell in der humanen Therapie von Nutzen sein, wenn es sich darum handelt aus Eiter, Blut usw. möglichst *schnell* eine Vaccine herzustellen.

Hat man einen oder die gewünschte Anzahl von Pneumokokken isoliert und wieder in die Pipette eingesogen, so nimmt man die ganze Pipette aus dem Mikromanipulator hinaus, schneidet einer weißen Maus eine Hauttasche, schiebt den Endteil der Pipette in diese hinein und bricht sie mit einer Pinzette subcutan ab. Dabei muß man die größte Vorsicht anwenden, um nicht vorher mit der makroskopisch unsichtbaren Mündung an ein Haar usw. der Maus heranzukommen; das würde nämlich unbedingt ein Herausquellen des die Pneumokokken enthaltenden ersten Tröpfchens bedeuten. Die Schnittwunde braucht nicht durch Naht geschlossen zu werden, man kann sie aber mit Kollodium abdichten. Berührt die abgebrochene Pipette das subcutane Gewebe, so strömt durch Capillaradhäsion der oder die Keime ins Gewebe hinein.

Ich habe mit dieser Methodik 104 weiße Mäuse infiziert. Ich benutzte zur Infektion einen hochvirulenten Pneumokokkenstamm, den unser Institut der Liebenswürdigkeit von Professor *Wadsworth* N. Y. State Albany durch freundliche Vermittlung des Direktors des Rockefeller Instituts in New York, Professor *Flexner*, verdankt. Dieser Stamm gehört zum Typus III der amerikanischen Autoren.

Als Nährboden benutzte ich die in einer Monographie des Institut Pasteur Paris von *Cotoni* und Mitarbeiter[1]) empfohlene Chapoteaut-Pepton-Traubenzucker-Nährlösung, in der oben erwähnter Stamm außerordentlich üppig, in feinen Wolken wächst.

Mäuse, die mit 1—50 Pneumokokken subcutan mit Erfolg infiziert worden waren, starben im allgemeinen 2—5 Tage post infectionem. Bei der Sektion fand man fast immer ein sehr starkes, sich weitverbreitendes zähgelatinöses Infiltrat, das von der Injektionsstelle ausging. Manchmal, besonders dann, wenn die Mäuse länger als 4 Tage überlebten, war die Injektionsstelle mit grünlichgelbem Eiter bedeckt. Sowohl im Infiltrat wie im Eiter fand man mikroskopisch ungeheuer viel Pneumokokken. Dabei war meistens 4—5 Stunden vor dem Tode des Tieres im aus der Schwanzvene entnommenen Blut von Pneumokokken keine Spur. Nur während der Agone, die im allgemeinen nicht länger als 3—4 Stunden dauerte, erschienen sie darin; wenn man das Tier nicht während der Agonie tötete, sondern den eingetretenen Exitus

[1]) *L. Cotoni, C. Truche, A. Raphael*, Pneumocoques et affections pneumococciques. Masson. Paris 1922.

abwartete, so fand man auch im Herzblut massenhaft Pneumokokken. In einer bestimmten Anzahl der Fälle kam es vor, daß am 1. bis 3. Tage nach der Injektion im Wundsekret sich Pneumokokken fanden; sie waren aber am 4. Tage nach der Injektion, falls das Tier am Leben blieb, nicht mehr aufzufinden. Es wurde jedesmal, um eine eventuelle exogene Pneumokokkeninfektion auszuschließen, aus dem Peritonealexsudat, aus dem Herzblut oder aus der von der Injektionsstelle gemachten Kultur nach Vorschrift der amerikanischen Autoren[1]) der Typus bestimmt. Es ergab immer denselben Typus III. Da in der Umgebung der infizierten Mäuse der auch sonst extrem seltene Typus III trotz sorgfältiger Untersuchungen kein einziges Mal gefunden wurde, kann man wohl mit Recht annehmen, daß eine exogene Infektion ausgeschlossen war. Mikroskopisch fand man bei allen verendeten Tieren das Bild der typischen Pneumokokkensepsis weißer Mäuse.

Um Raum zu sparen, wollen wir nicht alle infizierten Tiere mit der Zahl der infizierenden Pneumokokken, mit der genauen Bezeichnung der Infektionsstelle, mit dem Datum der Infektion und dem des Todes einzeln anführen (obwohl daraus manches interessante Moment herauszulesen wäre), sondern geben als Resultat dieser Untersuchungen die nachfolgende Tabelle:

von	21	mit	1	Pneumokokkus	infizierten	Mäusen	starben	5 = 23,8%
„	18	„	2	Pneumokokken	„	„	„	5 = 27,7%
„	23	„	3—5	„	„	„	„	7 = 30,4%
„	21	„	6—10	„	„	„	„	15 = 71,4%
„	12	„	11—20	„	„	„	„	10 = 83,3%
„	9	„	20—150	„	„	„	„	6 = 66,6%

Aus dieser Tabelle geht hervor, und ist hiermit zum *ersten Male mit Sicherheit bewiesen, daß ein einziger Keim ein empfängliches Tier zu töten vermag.* Man sieht außerdem eine sehr schöne Übereinstimmung zwischen der Anzahl der infizierenden Keime und der Mortalitätsziffer. Nur die letzte Rubrik unserer Statistik weist eine Diskrepanz auf. Dies ist damit leicht zu erklären, daß die Versuche, die mit so „großen“ Mengen von Pneumokokken angestellt wurden, aus der ersten Zeit meiner Arbeit stammen, also zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurden, in dem mir technische Fehler bei der Injektion sicherlich noch häufiger begegneten, als bei den späteren Infektionen.

Die Resultate beweisen ferner, wie groß der Einfluß der Zahl der Bakterien auf die Mortalitätsziffer ist und geben damit die Möglichkeit

---

[1]) *Avery, Chickering, Cole* und *Dochez*, Acute lobar Pneumonia. Monograph of the Rockefeller Institute 1917, Nr. 7.

die Schwere der Infektion experimentell sehr fein zu regulieren; eine Möglichkeit, die mit den bisherigen Methoden nur in grober Weise gegeben war. Sie eröffnen auch die Aussicht, das Studium der Virulenz dadurch zu einem exakteren zu gestalten, daß Kulturen usw. verschiedener Abstammung und Beeinflussung zahlenmäßig in Kultur- und Tierversuch miteinander verglichen werden.

Über die Resultate der von mir angestellten Pneumokokken-Ein-Zell-Kulturen wird in aller Kürze — die Untersuchungen sind bereits beendet — in einer besonderen Arbeit berichtet werden.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Péterfi für die gütige Einführung in seine Methodik meinen besten Dank auszusprechen.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. — Direktor: Geheimrat Prof. Dr. *M. Hahn.*)

Zur Biochemie pathogener Erreger.

Wachstum und Stoffwechselleistungen des Vibrio cholerae auf einfachen — chemisch definierten — Nährböden.

Von

Julius Hirsch,

Assistent am Institut.

Mit 8 Textabbildungen.

Inhalt.

I. Einleitung.

Untersuchungen über die biochemischen Leistungen pathogener Mikroorganismen haben zur Zeit wenig Berührung mit den eigentlichen Problemen der medizinischen Bakteriologie. Das Interesse der bakteriologischen Forschung richtet sich nämlich in erster Linie auf die *spezifischen* (z. B. krankheitserregenden) Wirkungen und Reaktionen der Erreger, die bisher lediglich durch die klinische Beobachtung und durch das biologische Experiment erfaßt werden können; denn die chemische Analyse der spezifisch wirkenden bakteriellen Zell- und Giftsubstanzen scheitert vorläufig noch an der Unzulänglichkeit, die unserer Kenntnis von dem chemischen und physikochemischen Aufbau hochmolekularer Naturstoffe (der Eiweißkörper, der Lipoide) anhaftet. Der chemischen Untersuchung sind vorerst nur die *physiologischen* Stoffwechselleistungen der Bakterien zugänglich, die den primitiven vitalen Funktionen der Erhaltung und der Vermehrung dienen, und die zumeist unter Versuchsbedingungen analysiert werden, die von den Verhältnissen des natürlichen Nährsubstrates innerhalb und außerhalb des erkrankten Organismus erheblich abweichen.

So klafft eine — in erster Linie methodisch bedingte — Lücke zwischen den Beobachtungen, die die pathogenen Eigenschaften der Bakterien betreffen, und den Kenntnissen ihrer chemischen Leistungen. Es ist daher nicht erstaunlich, daß die medizinische Bakteriologie sich der chemischen Methoden fast ausschließlich zu den praktischen Zwecken der

Züchtung und der Differentialdiagnose bedient, und daß eine theoretisch orientierte Biochemie der pathogenen Mikroorganismen als selbständige Arbeitsrichtung kaum betrieben wird.

Die grundlegenden Untersuchungen, die in neuerer Zeit auf dem Gebiete der Fermentforschung, der Zellphysiologie und des intermediären Stoffwechsels (z. B. von *Abderhalden*, *Embden*, *Jacoby*, *Meyerhof*, *Neuberg*, *Warburg*, *Willstätter*) ausgeführt worden sind, haben der biochemischen Forschung in Methode und Problemstellung neue Wege gewiesen. Diese Erfolge der allgemeinen Biochemie regen dazu an, eine systematische biochemische Untersuchung der pathogenen Erreger in Angriff zu nehmen. Dabei darf die Rücksicht auf die Frage, ob die eingeschlagene Arbeitsrichtung den Anschluß an epidemiologisch und klinisch bedeutsame Probleme der Bakteriologie erreichen wird, zunächst keine Rolle spielen: die Erfahrung hat aber immer wieder gezeigt, daß schließlich auch auf diesem Wege Erfolge für die Lösung praktisch wichtiger Probleme sich einstellen.

Die vorliegende — auf Veranlassung von Herrn Geheimrat *Hahn* durchgeführte — Untersuchung behandelt den Stoffwechsel des Vibrio cholerae[1]). Die Züchtung der Vibrionen wurde auf einer einfachen chemisch-definierten Nährlösung vorgenommen. Die biochemische Umwandlung des Nährsubstrates wurde mit den Methoden der quantitativen chemischen Analyse verfolgt. Die Ausbeute an Stoffwechsel-Endprodukten konnte in eine bilanzmäßige Beziehung zu dem umgesetzten Ausgangsmaterial gebracht werden.

Die zahlreichen in der Literatur vorliegenden Angaben über die chemischen Leistungen pathogener Bakterien beschränken sich größtenteils auf den qualitativen Nachweis der Stoffwechselprodukte. Bei der allgemein üblichen Verwendung von Bouillon- und Pepton-Nährböden kann die Herkunft der nachgewiesenen Substanzen nicht immer eindeutig erklärt werden. Die Züchtung auf den sog. „eiweißfreien" Nährlösungen hat in der bakteriologischen Praxis keine allgemeinere Anwendung gefunden. In einzelnen theoretischen Studien[2]) ist das kulturelle Verhalten pathogener Keime auf bestimmten chemischen Substanzen untersucht worden. Der Verwendungsstoffwechsel pathogener Bakterien ist in neuerer Zeit durch die Arbeiten von *H. Braun* und *C. E. Cahn-Bronner*[3]) in umfassender Weise bearbeitet worden. Ein ausgedehntes Versuchsmaterial bringt wichtige Ergebnisse über die Ausnutzbarkeit einfacher chemischer Verbindungen durch verschiedene Infektionserreger. Die biochemische Umwandlung der Stoffe wird indessen nicht weiter verfolgt. Die Untersuchungen beschränken sich auf die Prüfung des biologischen Verhaltens[4]). Die in der Literatur vorliegenden Angaben, die sich auf

[1]) Vgl. auch *Julius Hirsch*: Zur Biochemie des Vibrio cholerae. — Quantitative Untersuchung des Nitratstoffwechsels. Zeitschr. f. Hyg. **102**, 503. 1924.

[2]) Siehe die ältere Literatur im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und v. Wassermann Bd. I, S. 393.

[3]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **86**, H. 1, 3, 5. 1921; Biochem. Zeitschr. **131**, 226, 272. 1922; **145**, 381. 1924.

[4]) Eine neuere von *O. Acklin* (Biochem Zeitschr. **164**, 312. 1925) ausgeführte Arbeit zur Biochemie des *Bacterium pyocyaneum* beschränkt sich bezüglich des

die in dieser Arbeit experimentell behandelten Fragen beziehen, sollen im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen behandelt werden.

II. Methodik.

Die Bereitung der Nährlösungen. Zur Untersuchung gelangten ausschließlich Kulturen auf flüssigen Nährböden. Die notwendigen chemisch-reinen Mineralsalze wurden abgewogen und nach Zusatz einer Phosphat-Pufferlösung von bestimmter H-Ionenkonzentration mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt; die Mineralsalzlösung wurde dann sterilisiert. Die als H- und C-Quelle dienenden organischen Verbindungen wurden entweder in Substanz einer entsprechenden Menge Mineralsalzlösung zugesetzt (woran sich eine nochmalige Sterilisation anschloß) oder aber sie wurden in bereits steriler wässeriger Lösung zugegeben. Für die alkaliempfindlichen Kohlenhydrate kam nur das zweite Verfahren in Frage.

Die Züchtung der Kulturen geschah im allgeneinen in 2 l fassenden *Fernbach*-Kolben; für die besonderen Zwecke der Kohlensäureermittlung dienten ventilierbare Kulturröhren (s. u.).

Chemisch-analytische Methoden. Zur Ermittlung des Ausgangsmaterials und der entstehenden Endprodukte wurden die *üblichen Methoden* der chemischen Analyse herangezogen. Technische Besonderheiten, die sich aus der Eigenart der verarbeiteten Materials ergaben, werden in den betr. Versuchsprotokollen aufgeführt.

Eine besondere Versuchsanordnung erforderte die *Bestimmung der Kohlensäure,* die bei der biochemischen Umsetzung der Nährstoffe gebildet wird. Das Prinzip der CO_2-Ermittlung beruht darauf, daß durch eine Kultur ein kohlensäurefreier Luftstrom geleitet wird, der die gasförmigen Stoffwechselprodukte aus der Nährlösung entfernt und in absorbierende Lösungen überführt.

Apparatur: Der Luftstrom durchstreicht zuerst eine mit 30 proz. Kalilauge gefüllte Waschflasche und steigt in einem Natronkalkturm empor, der neben der restlosen Absorption der Luftkohlensäure eine Filtration der Luftkeime ermöglicht. Vom Natronkalkturm führt ein Verbindungsrohr durch die Wand des Brutschrankes[1]) zum Kulturrohr. Zur Züchtung kleiner Kulturmengen (bis zu 10 ccm) dient eine U-Röhre, deren Schenkel (zur Aufnahme der vorwärts- bzw. rückwärtsgetriebenen Flüssigkeitssäule) mit kugeligen Erweiterungen versehen sind. Ein Ver-

quantitativen Stoffwechsels auf die Bestimmung des Nitrat- und Ammoniakumsatzes und sucht die übrigen Stoffwechselleistungen aus *qualitativen* Reaktionen zu deuten. (Der Autor hält es für notwendig, die von mir [Zeitschr. f. Hyg. **102**, 503] benutzte *Strecker*sche Methode der Nitratbestimmung in den Mengenverhältnissen der Reagenzien zu modifizieren, jedoch dürfte das zur Begründung angeführte restlose Übergehen der HCl in den Azotometer nur *rechnerisch* möglich sein.)

[1]) Benutzt wurde der von *A. Korff-Petersen* und *W. Liese* angegebene, aus Holz gefertigte Brutschrank mit elektrisch geheiztem Luftmantel. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Ref. **76**, 189. 1924.

bindungsrohr leitet den Luftstrom, nachdem er die Kultur passiert hat, aus dem Brutschrank heraus und zu einem mit $^n/_{10}$-Salzsäure beschickten Péligotrohr. Hier wird das mitgeführte Ammoniak gebunden, während die produzierte Kohlensäure zu einem mit Barytwasser gefüllten Absorptionsapparat weiterbefördert wird. Als Absorptionsapparat dient das an eine Barytwasserbürette und Wasserbürette angeschlossene Glasgefäß, das *M. Hahn* und *J. Hirsch* für die quantitative Bestimmung kleiner CO_2-Mengen in der Luft beschrieben haben[1]).

An das Absorptionsgefäß schließt sich ein mit Natronkalk gefülltes U-Rohr an, das die Verbindung mit dem — 10 l Wasser fassenden — Aspirator herstellt.

Gang des Versuches: Das im Trockenschrank sterilisierte U-Kulturrohr wird im Brutschrank an die Enden der Verbindungsröhren angeschlossen, wobei der Watteverschluß des ableitenden Schenkels entfernt, der des zuleitenden Schenkels in das Rohr etwas hineingedrückt wird. In das Péligotrohr wird eine abgemessene Menge $^n/_{10}$-HCl einpipettiert. Mittels des Aspirators werden mehrere Liter kohlensäurefreier Luft durchgeleitet. Sodann wird aus der Bürette eine abgemessene Menge Barytlauge in das Absorptionsgefäß eingelassen. Die Verbindung zwischen Aspirator und Natronkalk-U-Rohr wird unterbrochen, sodaß ein Druckausgleich mit der Außenluft hergestellt wird. Der ableitende Schenkel des Kulturgefäßes wird von seiner Verbindung gelöst und abgeflammt; die bereits beimpfte Nährflüssigkeit wird einpipettiert und alle Verbindungen werden wieder hergestellt. Die Tätigkeit des Aspirators wird so reguliert, daß etwa 6—8 ccm Wasser/Min. abtropfen.

Zur titrimetrischen Ermittlung der durch die Barytlauge gebundenen Kohlensäure wird der Inhalt des Absorptionsgefäßes in ein an die untere Öffnung angeschlossenes Meßkölbchen [50 ccm][2]) abgelassen; das Absorptionsgefäß wird mit CO_2-freiem Wasser (aus der Wasserbürette) quantitativ ausgespült. Das bis zur Marke aufgefüllte Meßkölbchen wird mit einem hohlen Schliffstopfen verschlossen, an den ein mit einem Natronkalkröhrchen verbundenes kurzes Rohr und ein mit Schlauch und Quetschbahn versehenes, bis zum Boden des Kölbchens reichendes langes Rohr seitlich eingeschmolzen sind. Zur titrimetrischen Bestimmung kann der Inhalt nach Öffnen des Quetschhahnes — unter Ausschluß der Luftkohlensäure — abpipettiert werden. Die Titration mit $^n/_{10}$-Oxalsäure geschieht aus einer in $^1/_{100}$ ccm geteilte Mikrobürette.

Die Apparatur gestattet, die von einer Bakterienkultur in bestimmten Zeitabschnitten abgegebene *freie* Kohlensäure zu messen. Die in der Kulturflüssigkeit (bei alkalischer Reaktion) *gebundene* Kohlensäure wird ermittelt, indem nach Beendigung des Versuches die Kulturflüssigkeit mit eini-

[1]) Zeitschr. f. Hyg. **105**, 172. 1925.
[2]) Siehe *M. Hahn* und *J. Hirsch* l. c.

gen ccm einer Mineralsäure angesäuert und die Luftdurchleitung solange fortgesetzt wird, bis sich frisch vorgelegte Barytlauge nicht mehr trübt.

Werden größere Mengen von Nährlösung (100—500 ccm) umgesetzt, so wird statt der titrimetrischen CO_2-Bestimmung die gravimetrische Ermittlung vorgenommen. Zur Absorption der Kohlensäure dienen die bei der organischen Elementaranalyse gebräuchlichen Kaliapparate. Für die vorliegende Versuchsanordnung haben sich die von *J. Friedrichs*[1]) angegebenen Schraubenkaliapparate als zweckmäßig erwiesen. An das Péligotrohr wird zunächst zum Trocknen des Luftstromes ein Chlorcalciumrohr angeschaltet; es folgen hintereinander zwei Schraubenkaliapparate, deren Gewichtszunahme in bestimmten Zeitabschnitten ermittelt wird.

Für die Umsetzungen größerer Kulturmengen werden zylindrische Züchtungsgefäße (s. Abb. 1) benutzt, in die ein bis zum Boden reichendes senkrechtes Einleitungsrohr und oben seitlich ein Ableitungsrohr eingeschmolzen sind. Das Ableitungsrohr trägt ein kleines Reservoir, das das zurückfließende Kondenswasser auffängt. Ein langer, seitlich eingesetzter Tubus, der mit einem Watte- und darüber mit einem Gummistopfen verschlossen ist, gestattet die Impfung und die Entnahme der Kulturflüssigkeit, ohne daß die Verbindungen mit der Apparatur gelöst zu werden brauchen. Die Kulturgefäße sind aus stabilem, schwer schmelzbarem Glase angefertigt. Die Sterilisation der Nährlösungen wird in diesen Züchtungsröhren direkt vorgenommen; die Beimpfung erfolgt erst, nachdem die Apparatur gründlich mit CO_2-freier Luft durchspült worden ist.

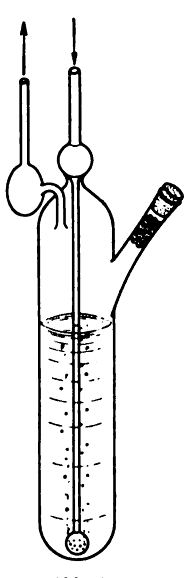


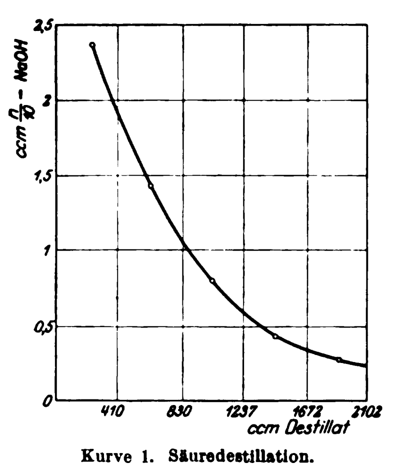
Abb. 1. Züchtungsröhre.

Zur Isolierung und *quantitativen Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren* wurde an Stelle der üblichen Wasserdampfdestillation das von *E. Welde*[2]) angegebene Verfahren durchgeführt. Die Destillation der angesäuerten Kulturlösung findet im Vakuum unter gleichzeitigem Einleiten von Wasserdampf statt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß bei der erniedrigten Siedetemperatur (ca. 40°) eine hydrolytische Zersetzung säureempfindlicher Substanzen vermieden wird, und daß das Übertreiben der Fettsäuren mit erheblich geringeren Wassermengen in kürzerer Zeit vor sich geht als bei der Destillation unter atmosphärischem Druck. Das Destillat wird in etwa gleichgroßen Portionen aufgefangen, deren Säuregehalt einzeln austitriert wird. Die Destillation wird solange fortgesetzt, bis der Titerwert auf $^1/_{10}$ des anfänglich festgestellten herabgesunken ist. Aus

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem. **32**, 129. 1919.

[2]) Biochem. Zeitschr. **28**, 504. 1910; siehe auch *F. Edelstein* und *F. v. Csonka*, Biochem. Zeitschr. **42**, 372. 1912.

der nachstehend angeführten Tabelle und der graphischen Darstellung Kurve 1 geht hervor, daß der Titerwert der Destillate mit abnehmendem Säuregehalt der destillierten Lösung sich asymptotisch dem Nullpunkt nähert.[1])



Kurve 1. Säuredestillation.

Beispiel: 400 ccm einer — flüchtige Fettsäuren enthaltenden — Kulturlösung werden unter Zusatz von 30 ccm Phosphorsäure (D = 1,3) im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Je 10 ccm Destillat werden erhitzt und mit $^{n}/_{10}$-NaOH (Mikrobürette) unter Zusatz von Phenolphthalein titriert.

Destillat Nr.	Menge des Destillates	Titerwert: 10 ccm =
1	410 ccm	2,38 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH
2	420 „	1,42 „ $^{n}/_{10}$-NaOH
3	407 „	0,80 „ $^{n}/_{10}$-NaOH
4	435 „	0,45 „ $^{n}/_{10}$-NaOH
5	430 „	0,30 „ $^{n}/_{10}$-NaOH
6	195 „	0,20 „ $^{n}/_{10}$-NaOH

III. Ergebnisse.

A. Das Wachstum von Choleravibrionen auf Asparaginsäure als N- und C-Quelle.

Die Züchtung des Vibrio cholerae auf chemisch definierten Nährböden ist zuerst von *Uschinsky*[2]) beschrieben worden. Die Nährlösung enthielt neben den anorganischen Salzen (NaCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, K_2HPO_4) als organische Bestandteile Glycerin, milchsaures Ammoniak und asparaginsaures Natrium. *L. Brieger* und *G. Cohn*[3]) bestätigen die Brauchbarkeit des Nährbodens. *C. Fraenkel*[4]) untersuchte die Entbehrlichkeit der einzelnen im Uschinsky-Gemisch vorhandenen Bestandteile und stellte fest, daß die Choleravibrionen auf einer Kochsalz, Phosphat und Asparaginsäure enthaltenden Lösung gut angehen. *O. Voges*[5]) empfahl die Verwendung des Uschinskyschen Nährbodens zur Choleradiagnose. Die Angaben von *B. Kisch*[6]) über die Verwertbarkeit verschiedener N- und C-Quellen durch den V. cholerae beziehen sich auf feste Nährböden und sind wegen des Zusatzes von Agar nicht unbedingt eindeutig. *H. Braun* und *C. E. Cahn-Bronner*[7]) konnten auf Milchsäure-Ammoniaknährböden bei 4 Cholerastämmen keine Vermehrung in Passagen erzielen, ebensowenig gelang ihnen die Kultur auf Asparaginsäure- und Leucin-Milchsäurenährboden. Alle erwähnten Arbeiten lassen zahlenmäßige Angaben

[1]) *Arturri I. Virtanen* (Ref. Chem. Zentralbl. 1926. I. 744) gibt an, daß unter gewöhnlichem Druck und im Vakuum Milchsäure in gewissen Mengen mit dem Wasserdampf überdestilliert. Ich konnte bei der Verarbeitung von milchsäurehaltigen Kulturen (siehe u. III. C) in den neutralisierten und auf wenige Kubikzentimeter eingeengten Destillaten *keine* Milchsäure nachweisen.

[2]) Zentralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. **14**, 316. 1893.

[3]) Zeitschr. f. Hyg. **15**, 10. 1893.

[4]) Hygien. Rundschau 1894, Nr. 17.

[5]) Zentralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. **15**, 453. 1894.

[6]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **82**, S. 40. 1919.

[7]) Biochem. Zeitschr. **131**, 293. 1922.

über die Vermehrung der Vibrionen und über das Verhalten in Passagen vermissen; auch findet das Schicksal der umgesetzten chemischen Substanzen keine Beachtung.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit einem seit vier Jahren im Institute fortgezüchteten Cholerastamm (Kowno I) ausgeführt, der eine normale Agglutination und Tiervirulenz zeigte. Vorbereitende Versuche dienten der Auffindung eines zusagenden Nährbodens, der den notwendigen Stickstoff und Kohlenstoff in Form einer aliphatischen Aminosäure lieferte. Die zugrunde liegende Mineralsalzlösung enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Dikaliumphosphat und 0,02% Magnesiumsulfat. Die Aminosäuren wurden in m-Lösungen ihrer Natriumsalze zugesetzt; der Gehalt der Nährlösungen an Aminosäuren entsprach einer $^{m}/_{20}$-Lösung. Auf Glykokoll und Leucin fand eine Vermehrung der eingeimpften Vibrionen nicht statt. Besser gediehen sie auf Alanin; Asparaginsäure schien die günstigsten Wachstumsbedingungen zu bieten. Die Angreifbarkeit der Aminosäuren durch Choleravibrionen wurde qualitativ durch den Nachweis des auftretenden Ammoniaks geprüft. Die Intensität der *Nessler*schen Reaktion entsprach vergleichsweise dem Grade der durch die Bakterien hervorgerufenen Trübung. Bevor wir zahlenmäßige Belege für das kulturelle Verhalten der Choleravibrionen auf Asparaginsäure bringen, soll noch auf die Bedeutung der Salze und der H-Ionenkonzentration für das Wachstum des Vibrio cholerae eingegangen werden.

C. Fraenkel (l. c.) wies bereits darauf hin, daß von den von *Uschinsky* angegebenen Mineralsubstanzen die Kalk- und Magnesiumsalze entbehrlich sind. Phosphat und Kochsalz scheinen auch nach unseren Beobachtungen für die Züchtung der Vibrionen unerläßlich zu sein. Über die Bedeutung der einzelnen Anionen und Kationen läßt sich nichts Bestimmtes aussagen, solange die von den üblichen Glasgefäßen abgegebenen Alkalien, Erdalkalien usw. und die auch in den reinsten Chemikalien vorhandenen spurenhaften Verunreinigungen unberücksichtigt bleiben. Der Einfluß der Salz*konzentration* auf das Wachstum der Choleravibrionen steht nach Angaben von *I. Kabelik* und *S. Freudmann*[1]) in Abhängigkeit von der H-Ionenkonzentration. Die optimale NaCl-Konzentration soll bei neutraler Reaktion um 3% liegen und bei höherer Alkalinität schnell absinken. Die Beobachtungen wurden an Peptonwasserkulturen gewonnen; für den praktischen Gebrauch wurde ein 3 proz. Salz-Peptonwasser empfohlen. Nach *J. Beauverie*[2]) sowie *James M. Sherman* und *George E. Holm*[3]) scheint die Salzkonzentration des Nährbodens einer der Faktoren zu sein, die die Zellteilung begünstigen. Für den Fall des Vibrio cholerae fand *Beauverie* bei 3 proz. NaCl-Gehalt trotz guten Wachstums frühe Alterserscheinungen der Kulturen. *St. Sierakowski*[4]) ermittelte für Choleravibrionen eine optimale NaCl-Konzentration von 0,5%.

Wir beobachteten auf konzentrierten Salzlösungen ein langsames Angehen der Kulturen und haben uns im allgemeinen auf eine NaCl-Kon-

---

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **90**, 407. 1923.

[2]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **163**, 494, 769. 1917.

[3]) Journ. of bacteriol. **7**, 465, 583. 1923.

[4]) Przeglad epiden jol. **2**, 1—25; ref. Ber. f. d. ges. Physiol. **15**, 534. 1922.

zentration von 0,5% beschränkt, zumal die anfängliche [H˙] der Kulturen 7,6 bis 8,0 betrug.

Seitdem die Bestimmung der Wasserstoffzahl nach *S. P. L. Soerensen*[1]), insbesondere aber die vereinfachte Indicatorenmethode nach *L. Michaelis* und *A. Gyemant*[2]) sich in der bakteriologischen Untersuchungstechnik eingebürgert haben, ist der Bedeutung der H-Ionenkonzentration für das Wachstum pathogener Bakterien und der Veränderung der [H˙] auf den verschiedensten Nährsubstraten eine erhöhte Beachtung entgegengebracht worden. Systematische Arbeiten haben auf diesem Gebiete *Michaelis* und *Marcora*[3]), *Mansfield Clark*[4]), *K. G. Dernby*[5]), *Charles G. L. Wolf*[6]), *Cluzet*[7]), *F. Verzar*[8]), *S. Sierakowski*[9]) und *E. Speyer*[10]) ausgeführt. Für das Verhalten der Wasserstoffzahl bei der Züchtung des Vibrio cholerae auf eiweißfreien Nährlösungen liegen keine Literaturangaben vor.

In den später angeführten Protokollen ist die Wandlung der Wasserstoffionenkonzentration unter verschiedenen Versuchsbedingungen vermerkt; den Daten kann folgendes Ergebnis entnommen werden:

Die optimale H-Ionenkonzentration für das Wachstum der Choleraerreger erstreckt sich über das breite Gebiet von $p_H = 7,6-8,0$; dieses entspricht den Erfahrungen der praktischen Choleradiagnose, die von jeher zur Anreicherung und Isolierung der Vibrionen Nährböden mit alkalischer Reaktion bevorzugte. Je nach der Art des umgesetzten Substrates und der entstandenen Stoffwechselprodukte erfährt die anfängliche H-Ionenkonzentration eine Verschiebung nach der einen oder anderen Richtung. Bei Anwesenheit von Kohlenhydraten führen die entstehenden Säuren schnell zu einer für Vibrionen tödlichen p_H von $5,6-5,4$; zuckerfreie Aminosäurenährböden zeigen in vielen Fällen eine zunehmende Alkalisierung, die $p_H = 8,4$ überschreitet und die zuweilen ein Absterben der Keime zur Folge hat.

Die starke Schwankung der H-Ionenkonzentration in den Bakterienkulturen, die sich auch aus den oben angeführten Untersuchungen anderer pathogener Erreger ergibt, stellt eine für die mikrobiologischen Umsetzungen charakteristische und wichtige Erscheinung dar. Der Einfluß der durch die entstandenen Stoffwechselprodukte veränderten Wasserstoffionenkonzentration erstreckt sich nicht allein auf die *Vitalität* der Bakterienzelle, sie ist auch rückwirkend für den *weiteren Verlauf der biochemischen Reaktionen* von ausschlaggegender Bedeutung. Der

[1]) Biochem. Zeitschr. **21**, 131. 1909.
[2]) Biochem. Zeitschr. **109**, 165. 1920.
[3]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **14**, 170. 1912.
[4]) Journ. of biol. chem. **22**, 87. 1915.
[5]) Ann. de l'inst. Pasteur **35**, 277. 1921; Biochem. Zeitschr. **132**, 412. 1923.
[6]) Biochem. journ. **16**, 541. 1922.
[7]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **178**, 1638. 1924.
[8]) Biochem. Zeitschr. **141**, 13. 1923.
[9]) l. c.; Compt. rend. de la soc. de biol. **89**, 1371. 1924; Biochem. Zeitschr. **151**, 15; **152**, 111. 1924.
[10]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. **1**, Orig. **93**, 340. 1924.

Zerfall und die Umlagerung organischer Verbindungen kann nach den Erfahrungen der Chemie und Biochemie auf verschiedenen Wegen erfolgen, deren Richtung in wesentlicher Abhängigkeit von der H-Ionenkonzentration steht. So konnten *C. Neuberg* und *J. Hirsch*[1]) nachweisen, daß unter dem Einfluß von Alkalien die alkoholische Zuckerspaltung von der Reaktionsfolge der normalen Gärung abgelenkt und zu einer Dismutation des intermediär auftretenden Acetaldehyds geführt wird. Der entscheidende Einfluß der wechselnden Wasserstoffzahl auf die mikrobiologischen Stoffwechselvorgänge ergibt sich aus einer vergleichenden Betrachtung des Verhaltens der [H˙] im höher organisierten Tierkörper. Die in den intermediären Stoffwechsel des tierischen Organismus aufgenommenen Substanzen unterliegen einer Umwandlung, die innerhalb eines eng begrenzten p_H-Bereiches abläuft. Die ständig regulierte Pufferung der entstehenden Stoffwechselprodukte bewahrt die animalischen Zellen vor den schädigenden Einflüssen einer extremen [H˙]-Schwankung und vermeidet einen abwegigen („unphysiologischen") Umsatz des Nährsubstrates. Durch eine souveräne Beherrschung der H-Ionenkonzenztration zwingt der Tierkörper die zugeführten Substanzen in einen zweckentsprechenden Reaktionsverlauf, während die Bakterienzelle — in ihrer Existenz und ihrer biochemischen Funktion — den exogen bedingten Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration bedingungslos unterworfen ist. Die natürlichen Puffer des Bakterienplasmas, die nach den Befunden von *K. von Angerer*[2]) und von *M. Balint*[3]) im Zellinneren eine konstante Wasserstoffzahl aufrecht erhalten, sowie die dem Nährboden zugesetzten künstlichen Puffersysteme sind bei lebhaftem Stoffumsatz nicht imstande, die Reaktion des Milieus entscheidend zu beeinflussen. Daher kann einer starken Säuerung der Nährlösung nur durch den üblichen Zusatz von Calciumcarbonat begegnet werden.

Eine Nährlösung, die als ausschließliche Kohlenstoff- und Stickstoffquelle Asparaginsäure enthält, liefert für die Vermehrung der Vibrionen ein ebenso einseitiges wie eindeutiges Material. Die Verwendungsfähigkeit dieses Bausteines zur Synthese des Bakterienleibes wurde durch die Feststellung der Bakterienvermehrung geprüft. Bei einer derartigen Untersuchung genügte es nicht, das Wachstum bei einer erstmaligen Züchtung in der einfach zusammengesetzten Nährlösung zu verfolgen, da die Möglichkeit bestand, daß bei der ersten Einsaat aus dem vorhergehenden Nährsubstrat andersartige Stoffe eingeschleppt oder daß das absterbende Impfmaterial zum Aufbau herangezogen wurde[4]). Durch

[1]) Biochem. Zeitschr. **96**, 192. 1919; **100**, 304. 1919.
[2]) Arch. f. Hyg. **89**, 327. 1920.
[3]) Biochem. Zeitschr. **152**, 92. 1924.
[4]) Siehe *M. v. Eisler*, Über das Wachstum von Bakterien auf ihren arteigenen und fremden Leibesbestandteilen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **81**, 196. 1918.

eine fortlaufende Passage der Erreger auf der chemisch-definierten Nährlösung wurde die Wirkung solcher Substanzen infolge der enormen Verdünnung sicher ausgeschaltet. Eine unzulängliche Verwertbarkeit der Aminosäure hätte sich — bei wiederholter Passage — in einer Herabsetzung der Vermehrung äußern müssen. Vielfache Beobachtungen bei wochenlanger Züchtung auf mehr als 20 Passagen ergaben, daß die Asparaginsäure imstande ist, den Nahrungsbedarf des Vibrio cholerae voll zu decken. Der Trübungsgrad der Kulturen erfuhr mit fortschreitender Züchtung eher eine Verstärkung und wies auf eine zunehmende Bakterienerzeugung hin. Wir haben die quantitative Ermittlung der Bakterien*masse* bisher nicht verfolgt, sondern uns auf die Zählung der *wachstumsfähigen* Keime in den 24stündigen Passagen beschränkt.

Versuch 1.

Die zur Züchtung verwendete Nährlösung enthält in 100 ccm 0,5 g NaCl, 0,1 g KCl, 10,0 ccm $^m/_{15}$-Phosphatpuffer, 1,33 g Na-asparaginat. $p_H = 8,0$.

Zu 2 ccm dieser Lösung wird jedesmal 1 ccm Bakteriensuspension (Verdünnungen aus der vorhergehenden Passage) hinzugegeben. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° wird die Keimzahl nach dem Plattenverfahren von *M. Neisser*[1]) ermittelt. Für die 1. Passage findet die Aufschwemmung einer 24stündigen Agarkultur von Cholera Kowno I Verwendung. Die folgende Tabelle gibt die aus doppelten Zählungen hervorgegangenen Mittelwerte wieder.

Passage	Keimzahl pro cm	
	Einsaat	Ernte n. 24 Std.
1.	$1,6 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^8$
	$1,6 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^8$
	$1,6 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^8$
2.	$1,0 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^8$
	$1,0 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^8$
	$1,0 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^8$
3.	$7,1 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^8$
	$7,1 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^8$
	$7,1 \cdot 10^3$	$4,7 \cdot 10^8$
4.	$1,5 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^8$
	$1,5 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^8$
	$1,5 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^8$
5.	$1,7 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^8$
	$1,7 \cdot 10^5$	$5,3 \cdot 10^8$
	$1,7 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^8$
6.	$1,7 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^8$
	$1,7 \cdot 10^5$	$0,9 \cdot 10^8$
	$1,7 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^8$
7.	$5,8 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^8$
	$5,8 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^8$
	$5,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^8$

Die nach 24stündiger Züchtung aufgefundene Zahl der wachstumfähigen Vibrionen ist unabhängig von der Menge der eingeimpften Keime und erreicht in allen Passagen die Größenordnung von 10^8 pro Kubikzentimeter Nährlösung.

Die „physiologische Grenze des Bakterienwachstums“, die in der maximalen Zeit der gleichzeitig lebenden Zellen zum Ausdruck kommt, hat in jüngster Zeit durch die Untersuchungen von *O. Bail* und seinen Mitarbeitern *E. Singer* und *F. Hodler*[2]) eine erneute eingehende Bearbeitung gefunden. Entgegen den bisherigen Anschauungen kommt *Bail* zu dem Ergebnis, daß äußere Ursachen (Nährbodenveränderungen, Hemmungsstoffe usw.) für das Aufhören der Bakterienzunahme nach erreichter Maximalkonzentration nicht verantwortlich gemacht werden können. *Bail* stellt die maximal erreichbare Konzentration in Parallele zu der physikalisch bedingten Dichtigkeitsgrenze von Suspensionen und kolloiden Systemen.

[1]) *M. Neisser*, Handbuch der mikrobiologischen Technik Bd. II, S. 1086.
[2]) Arch. f. Hyg. **94**, 54, 353. 1924; **95**, 1. 1925.

Auch auf Grund unserer Untersuchungen dürfte die Veränderung des Nährsubstrates im Verlaufe der biochemischen Spaltungsvorgänge nicht die Ursache dieser gesetzmäßigen Beschränkung der Bakterienzahl sein. Aus der quantitativen Ermittlung des Stoffumsatzes und der gleichzeitigen Zählung der lebenden Keime (s. die Versuche 3 und 5) geht hervor, daß die maximale Konzentration zu einer Zeit erreicht und bereits wieder verlassen wird, in der eine wesentliche biochemische Umsetzung des Nährbodens noch nicht stattgefunden hat. Unter den Bedingungen unserer Versuchsanordnung kann auch von der vorzeitigen Erschöpfung eines besonderen — das Wachstum bedingenden oder fördernden — Stoffes nicht die Rede sein. Daß der vollständige Abbau der stoff- und energieliefernden Substanz und die fortschreitende Anhäufung von Spaltungsprodukten letzten Endes ein Absterben der Keime herbeiführen, hat mit dem frühzeitig auftretenden Phänomen der maximalen Konzentration nichts zu tun.

Auf jeden Fall darf die *Asparaginsäure als ein ausreichendes Substrat* für die Züchtung der Choleravibrionen angesprochen werden, da — trotz der einseitigen Ernährung — die maximal erreichbare Zahl lebender Keime in den fortlaufenden Passagen keine Verminderung erfährt.

In der Form (Involutionserscheinungen) und in der Beweglichkeit zeigten die Vibrionen der Asparaginsäurekulturen kein bemerkenswertes Abweichen von den Keimen der auf Agar gezüchteten Stammkultur. Hingegen wuchsen die aus eiweißfreien Lösungen auf alkalische feste Nährböden zurückgebrachten Keime zu auffallend schlanken und langen sowie gleichmäßig gekrümmten Individuen heran.

B. Der Abbau der l-Asparaginsäure (Aminobernsteinsäure) durch den Vibrio cholerae.

Das biochemische Verhalten der l-Asparaginsäure sowie seines Amids, des l-Asparagins, ist zuerst bei der Zersetzung durch Fäulnis untersucht worden. *Hoppe-Seyler*[1]) beobachtete bei Behandlung von Asparagin mit faulendem Fibrin unter Luftabschluß das Auftreten von CO_2 und von Bernsteinsäure. *L. Borchardt*[2]) fand bei der Fäulnis der Asparaginsäure Bernsteinsäure, Propionsäure, CO_2 und NH_3. *D. Ackermann*[3]) isolierte aus faulender Asparaginsäure ebenfalls Bernsteinsäure. Bei der Zersetzung von Asparaginsäure sowie von Asparagin durch *Fäulnisbakterien* traten nach *C. Neuberg* und *C. Cappezzuoli*[4]) und nach *M. Brasch*[5]) Ameisensäure und die vorgehend aufgeführten Abbauprodukte auf. *Effront*[6]) konnte durch die Einwirkung von Blumenerde (*Buttersäurebakterien*) Asparagin in Ammoniak und flüchtige Säuren, vor allem Propionsäure, spalten.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **1**, 213. 1877/1878.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **59**, 96. 1909.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **60**, 488. 1909.
[4]) Biochem. Zeitschr. **18**, 424. 1909.
[5]) Biochem. Zeitschr. **22**, 403. 1909.
[6]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **148**, 238. 1909.

Die Dissimilation des Asparagins und der Asparaginsäure durch Bakterienreinkulturen hat zuerst *P. Nawiasky*[1]) untersucht. *Nawiasky* ließ den *Bacillus proteus vulgaris* in großen Massen (4—5 g Bakteriensubstanz auf 4—5 g Asparagin bzw. Asparaginsäure in 100 ccm Mineralsalzlösung) auf die stickstoffhaltigen Verbindungen einwirken. Die Aminosäure sowie das zugehörige Amid zerfielen in Bernsteinsäure, Essigsäure und Ammoniak. Eine Reihe von Arbeiten hat *A. Blanchetière*[2]) über die Einwirkung des *Bacillus fluorescens liquefaciens* Flügge auf das Asparagin in einem chemisch definierten Milieu durchgeführt. *Blanchetière* fand sowohl Bernsteinsäure wie Fumarsäure, daneben Äpfelsäure und Essigsäure. Er entwickelte eine Theorie des Abbaues der Asparaginsäure, wonach die Aminosäure über die Stufe des Iminosäurehydrats zunächst in die Ketosäure oder deren Enolform übergeführt wird. *O. Neubauer* und *K. Fromherz*[3]) haben bereits im Jahre 1910 — auf Grund der Vergärbarkeit der Phenylaminoessigsäure und der zugehörigen Ketosäure (p-Oxyphenylbrenztraubensäure) durch arbeitende Hefe — auf diesen Verlauf der Desaminierung der Aminosäuren hingewiesen. Schließlich haben *E. Aubel*[4]) sowie *J. Supniewski*[5]) die Umwandlung des Asparagins durch den Bac. pyocyaneus untersucht. *Aubel* konnte Äpfel-, Fumar-, Propion- und Ameisensäure, jedoch keine Bernsteinsäure nachweisen. Von *Supniewski* wurden — neben den von *Aubel* angegebenen Säuren — Spuren von Acetaldehyd im Destillate der Nährböden vorgefunden.

Die in der Literatur vorliegenden Beobachtungen zeigen, daß der biochemische Abbau der Asparaginsäure bzw. des Asparagins[6]) unter dem Einfluß verschiedenartiger Mikroorganismen zu einem Gemische von Endprodukten führt, das in seiner qualitativen und quantitativen Zusammensetzung erheblichen Schwankungen unterworfen ist. Dementsprechend sind zur Erklärung des Asparaginsäureumsatzes verschiedene Reaktionsfolgen herangezogen worden, die bei der Deutung unserer eigenen experimentellen Ergebnisse näher angeführt werden sollen. Alle Angaben stimmen jedoch darin überein, daß der biochemische Zerfall der Asparaginsäure von einer *Desaminierung* eingeleitet wird. Die initiale Abspaltung der Aminogruppe in Form von Ammoniak dürfte auch der Grund dafür sein, daß unter den biochemischen Spaltprodukten der Asparaginsäure niemals N-haltige Kohlenstoffverbindungen aufgefunden worden sind.

Über die chemischen Vorgänge, die sich bei der *Assimilation* der Asparaginsäure durch Bakterien abspielen, und die zum Aufbau der Zellsubstanzen führen, liegen keine Beobachtungen vor. Die synthetische Verwendung der Aminosäure durch verschiedene Mikroorganismen ist bisher ausschließlich durch das rein biologische Experiment der Züch-

---

[1]) Arch. f. Hyg. **66**, 209. 1908.

[2]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **163**, 206. 1916; Ann. de l'inst. Pasteur **31**, 291. 1917; **34**, 392. 1920.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **70**, 348. 1910/1911.

[4]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **173**, 179. 1923.

[5]) Compt. rend. de la soc. de biol. **89**, 1371. 1924; Biochem. Zeitschr. **154**, 98. 1924.

[6]) Die primäre Spaltung des Säureamids führt unmittelbar zur Aminosäure.

tung erwiesen. Der Aufbau der Bakterienzellen benötigt nur einen Bruchteil des dargebotenen Nährsubstrates. *Der Assimilationsprozeß spielt sich innerhalb einer Größenordnung ab, die hinter dem Umfange der energieliefernden Dissimilationsvorgänge verschwindet, und die in der Bilanz des gesamten Stoffumsatzes kaum in Erscheinung tritt.*

Zur Untersuchung der Asparaginsäurespaltung durch den Vibrio cholerae wurde das reine (100 proz.) asparaginsaure Natrium (*Kahlbaum*) benutzt. Das Salz zeigte in 10 proz. wässeriger Lösung einen Drehungswert von $[\alpha] = -6{,}5°$. Die folgenden Versuche, in denen das aminosaure Salz als alleinige N- und C-Quelle für das Wachstum und für den Energiebedarf der Vibrionen zur Verfügung stand, behandeln

1. den Umfang und den zeitlichen Verlauf des Umsatzes,
2. die Art und Menge der gebildeten Stoffwechselprodukte,
3. ihre bilanzmäßige Beziehung zu dem umgesetzten Ausgangsmaterial.

In den Versuchsprotokollen sind außerdem die Ergebnisse der p_H-Bestimmungen und einige Angaben über die Bakterienvermehrung aufgeführt, deren Bedeutung bereits im Zusammenhange dargestellt worden ist (siehe sub A).

Zunächst haben wir uns mit der Frage der Desaminierung beschäftigt, die wir durch Bestimmung des Ammoniaks analytisch verfolgt haben.

Versuch 2.

100 ccm einer Mineralsalzlösung, die 0,2% KCl, 0,3% NaCl, 0,02% $MgSO_4$, Mol./30 Phosphatpuffer enthält, werden mit 8 ccm einer $^m/_2$-Na-asparaginatlösung versetzt und mit einer 24stündigen Agarkultur von Cholera Kowno I beimpft. Anfangs-$p_H = 8{,}0$.

Nach 24 Stunden ist die Lösung getrübt, mikroskopisch findet sich eine Reinkultur von Choleravibrionen; Ammoniakreaktion nach *Nessler* positiv. Nach 96 Stunden beträgt $p_H = 8{,}4$; bei der kulturellen Prüfung auf Agar wachsen zahlreiche Kolonien an, deren Individuen auffallend schlanke und gleichmäßig gekrümmte Formen aufweisen.

Ammoniakbestimmung: (nach *M. Krüger* und *O. Reich*[1])].

25 ccm Kultur werden unter Zusatz einer methylalkoholischen Lösung von Bariumhydroxyd bei 30—40 mm Hg und 40—42° der Vakuumdestillation unterworfen. Die entweichenden Dämpfe durchstreichen eine Péligotsche Röhre, die 25 cm $^n/_{10}$-HCl enthält. Die Abnahme des Titers ergibt die in der vorgelegten Kulturflüssigkeit vorhandene Menge von Ammoniak.

a) 25 ccm Kultur = 5,0 ccm $^n/_{10}$-NH_3
108 „ „ = 21,6 „ $^n/_{10}$-NH_3

b) 25 ccm Kultur = 5,1 ccm $^n/_{10}$-NH_3
108 „ „ = 22,0 „ $^n/_{10}$-NH_3

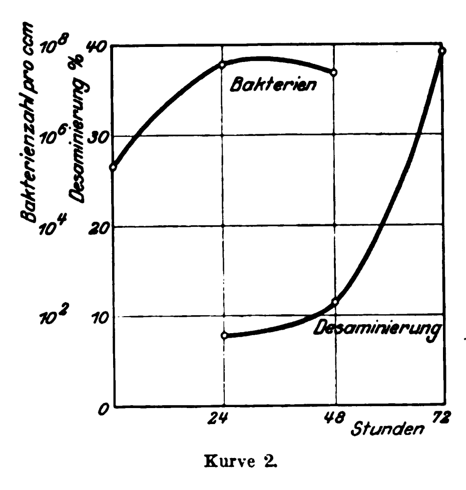
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 165. 1903.

Aus 8 ccm $^m/_2$ Natriumasparaginatlösung, deren völlige Desaminierung 40 ccm $^n/_{10}$-NH_3 ergeben würde, sind (im Mittel) 21,8 ccm $^n/_{10}$-NH_3 hervorgegangen. Somit sind 54,5% der eingebrachten Aminosäure von den Vibrionen aufgespalten worden.

Versuch 3.

Zu einer Mineralsalzlösung, die 0,5% NaCl, 0,2% K_2HPO_4, 0,02% $MgSO_4$ enthält, werden 0,3% asparaginsaures Natrium hinzugefügt. $p_H = 8{,}4$. Eingesät werden pro Kubikzentimeter $3{,}1 \cdot 10^5$ Keime einer 24 stündigen Cholerakultur auf Agar.

Nach 24 Stunden ist die Zahl der Bakterien auf $6{,}6 \cdot 10^7$ Keime pro ccm angewachsen. Nach 48 Stunden beträgt die Keimzahl $5{,}7 \cdot 10^7$ pro ccm. Die *Desaminierung* der Asparaginsäure wird durch die Bestimmung des Ammoniaks festgestellt.



Kurve 2.

Desaminierung:

Nach Stunden	% der zugesetzten Asparaginsäure
24	8,6
48	11,3
72	38,7

In Kurve 2 ist der Verlauf der Desaminierung und das gleichzeitige Verhalten der Bakterienzahl dargestellt (s. auch S. 443). $p_H = 8{,}4$ nach 72 Stunden. Beim Erhitzen mit Schwefelsäure entweichen flüchtige organische Säuren.

In den weiteren Versuchen haben wir uns nicht darauf beschränkt, die Menge des gebildeten Ammoniaks zu ermitteln, sondern wir haben durch Formoltitration nach *Soerensen*[1]) die Menge der vorhandenen (noch nicht umgesetzten) Aminosäure bestimmt. Die gleichzeitige Feststellung des Ammoniakstickstoffs und des Aminosäurestickstoffes mußte darüber Auskunft geben, ob andersartige stickstoffhaltige Produkte bei der Umsetzung der Asparaginsäure entstehen, und ob die Bestimmung des Ammoniaks in der Kulturflüssigkeit den tatsächlich umgesetzten Anteil der Asparaginsäure quantitativ erfaßt. Weiterhin wurde die Menge der bereits qualitativ nachgewiesenen flüchtigen Säuren durch das Verfahren von *E. Welde* (l. c.) titrimetrisch bestimmt und durch Bereitung des Silbersalzes ihre Identifizierung als Essigsäure durchgeführt.

[1]) Biochem. Zeitschr. 7, 45. 1907; die ausführliche Beschreibung der gleichzeitigen Ermittlung des Ammoniak-N und Aminosäure-N siehe *Jessen-Hansen*, Abderhaldens biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 245. 1922.

Versuch 4.

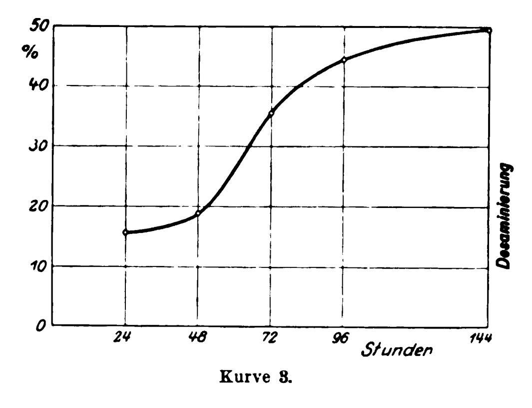
1 l Mineralsalzlösung enthält 5 g NaCl, 1 g KCl, 100 ccm $^m/_5$ Phosphatpufferlösung. $p_H = 7{,}8$.

950 ccm Mineralsalzlösung werden mit 50 ccm m-Lösung von asparaginsaurem Natrium versetzt. Je 500 ccm Kulturflüssigkeit werden mit 0,5 ccm einer 25stündigen Asparaginsäurekultur beimpft (20. Passage) und bei 37° bebrütet.

Der Aminosäureumsatz wird durch Bestimmung des noch vorhandenen Aminosäurestickstoffes sowie des entwickelten Ammoniakstickstoffes festgestellt.

Nach Stunden	enthalten 100 ccm Kultur				Desaminierung % Mittelwert aus a) u. b)
	a) Aminosäure-N		b) Ammoniak-N		
	mg	%	mg	%	
0	70	100	0	0	0
24	59,1	84,4	11,2	16,0	15,8
48	57,1	81,5	13,7	19,5	18,9
72	45,0	64,2	24,9	35,5	35,6
96	38,8	55,4	31,1	44,4	44,5
144	35,7	51,0	35,4	50,5	49,8

Der Verlauf der Desaminierung ist in nachstehender Kurve 3 graphisch dargestellt.



Kurve 3.

Bestimmung der flüchtigen Säuren: 700 ccm Kulturflüssigkeit (entsprechend 2,317 g umgesetzter Asparaginsäure) werden über Phosphorsäure im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Die Gesamtmenge der flüchtigen Säuren entspricht 5,02 ccm n-Säure. Umgerechnet auf Essigsäure (s. unten) entspricht diese Menge 0,301 g Essigsäure. Von dem umgesetzten Aminosäurekohlenstoff (0,836 g) sind 0,120 g = 14,4% in Essigsäure umgewandelt worden.

Identifizierung der Essigsäure: Die Destillate der flüchtigen Säuren werden mit chlorfreier Natronlauge alkalisch gemacht und eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ccm Wasser aufgenommen. Aus der mit verdünnter Salpetersäure schwach angesäuerten Lösung wird mit Silbernitrat das Silbersalz ausgefällt. Das schneeweiße Salz wird im Exsiccator getrocknet.

Silberanalyse: a) Substanz = 0,2267 g
Ag = 0,1469
= 64,79%

b) Substanz = 0,2104 g
Ag = 0,1360
= 64,63%

berechnet für $AgOOC \cdot CH_3$: Ag = 64,66%

Aus den Analysenwerten der Stickstoffbestimmungen geht hervor, daß pro Molekül umgesetzte Asparaginsäure 1 Molekül Ammoniak auftritt. Für andersartige stickstoffhaltige Produkte (wie z. B. Bakterieneiweiß) können nur solche Mengen in Betracht kommen, deren Größenordnung innerhalb der Fehlergrenzen der beiden Methoden für die Bestimmung des Aminosäure-N und die des NH_3-N fallen. Die Fraktion der flüchtigen Säuren besteht ausschließlich aus Essigsäure. Ameisensäure ist bei der Spaltung der Asparaginsäure durch die Choleravibrionen sicher nicht gebildet worden, da kleinste Spuren ein Dunkeln des Silbersalzes hätten hervorrufen müssen.

Versuch 5.

Die Mineralsalzlösung enthält im Liter: 5 g NaCl, 1 g KCl, 100 ccm $m/_5$-Phosphatpuffer. $p_H = 8,0$.

Zu 950 ccm Mineralsalzlösung werden 50 ccm einer m-Lösung von Na-Asparaginicum hinzugefügt. Gehalt an Asparaginsäure = 0,665%. In 100 ccm Kultur sind 70 mg Stickstoff enthalten. Die Kulturflüssigkeit wird mit einer Abschwemmung von Choleravibrionen (von einer 24stündigen Agarkultur) beimpft, in 2 Portionen (A und B) geteilt und in Fernbach-Kolben bei 37° bebrütet.

Zahl der lebenden Bakterien (bestimmt in Ansatz A)	
nach Stunden	in 1 ccm Kulturflüssigkeit
(Einsaat) 0	$9,7 \cdot 10^5$
(„) 24	$1,7 \cdot 10^7$
(„) 42	$2,2 \cdot 10^8$
(„) 92	$2,2 \cdot 10^6$

Aminosäureumsatz: Die nachfolgende Tabelle gibt die in 100 ccm Kultur aufgefundenen Werte für Aminosäurestickstoff und Ammoniakstickstoff.

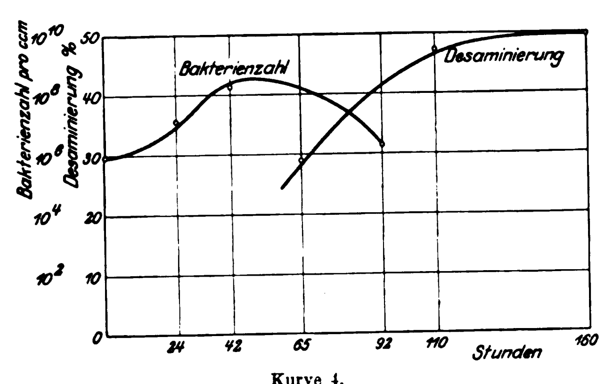
Nach Stunden	enthalten 100 ccm Kultur		Desaminierung % Mittelwert aus a) u. b)
	a) Aminosäure-N mg	b) Ammoniak-N mg	
0	70	0	0
65	48,1	19,8	29,8
110	37,3	33,6	47,3
161	34,2	33,6	49,5

Kurve 4 bringt den zeitlichen Verlauf der Asparaginsäurespaltung und das Verhalten der Bakterienzahl zum Ausdruck (s. auch S. 443).

Bestimmung der flüchtigen Säuren: 500 ccm von Ansatz B werden mit 20 ccm konz. Phosphorsäure im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Die Gesamtmenge der übergegangenen flüchtigen Säuren entspricht 4,91 ccm n-Säure = 0,294 g Essigsäure (= 0,117 g C). In 500 ccm Kultur sind nach dem Ergebnis der Stickstoffbestimmungen 1,645 g Asparaginsäure aufgespalten worden. Von dem umgesetzten Kohlenstoff, der dementprechend 0,593 g beträgt, sind 0,117 g = 19,7% in Essigsäure umgewandelt worden. Aus den eingeengten Destillaten wird das Silbersalz der flüchtigen Säuren dargestellt. Die Bestimmung des Silbergehaltes ergibt:

Subst. = 0,2294 g
Ag = 0,1485
= 64,73%

Berechnet für $AgOOC \cdot CH_3 : Ag$ = 64,66%.



Kurve 4.

Versuch 6.

Die Mineralsalzlösung enthält im Liter 5 g NaCl, 2 g KCl, 120 ccm $^m/_3$-Phosphatpuffer.

750 ccm Mineralsalzlösung werden mit 3 g Natriumasparaginat versetzt und zweimal $^3/_4$ Stunden im Dampftopf sterilisiert. Ammoniakreaktion negativ.

$p_H = 7{,}8$.

Einsaat: 1,8 · 10^5 Keime (Kowno I) pro Kubikzentimeter.

Bebrütung bei 37°.

Nach 144 Stunden wird der Versuch unterbrochen. $p_H = 8{,}0$.

Bestimmung des gebildeten Ammoniaks:

a) 50 ccm Kultur = 8,52 ccm $^n/_{10}$-NH_3; 750 ccm Kultur = 127,8 ccm $^n/_{10}$-NH_3 = 127,8 · 17,7 mg = 2,262 g Na-Asparaginat. *Desaminierung:* = 75,4%.

b) 50 ccm Kultur = 8,12 ccm $^n/_{10}$-NH_3; 750 ccm Kultur = 121,8 ccm $^n/_{10}$-NH_3 = 121,8 · 17,7 mg = 2,155 g Na-Asparaginat. *Desaminierung:* = 71,8%. Von 3 g Na-Asparaginat sind (Mittelwert) 2,20 g umgesetzt worden.

Bestimmung der flüchtigen Säuren: Der Rückstand der beiden Ammoniakbestimmungen plus 585 ccm Kultur werden mit H_3PO_4 angesäuert und im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Der Säurewert des

Gesamtdestillates = 4,69 ccm n-Säure = 4,69 · 0,06 = 0,281 g Essigsäure. In 685 ccm Kultur sind 2,00 g = 11,3 Millimol Na-Asparaginat umgesetzt worden; die gefundene Essigsäuremenge entspricht 4,69 Millimol. Von dem umgesetzten C sind 20,7% in Essigsäure umgewandelt worden.

Die Asparaginsäurespaltung erreicht bei einem anfänglichen Gehalt von $^{m}/_{20}$ = 0,665% (Versuch 4 und 5) in 6—7 Tagen einen Umfang von etwa 50%; von einer 0,225proz. Lösung (Versuch 6) werden in der gleichen Zeit etwa 70% umgesetzt. Die Versuche 5 und 6 bestätigen, daß (*innerhalb der analytisch erfaßten Größenordnung*) der Stickstoff der Aminosäure restlos in Ammoniak übergeführt wird. Als N-freies Spaltprodukt der Asparaginsäure findet sich Essigsäure in einer Menge von etwa 15—20% der umgesetzten Aminosäure vor. Das Auftreten irgendeiner anderen flüchtigen Säure kann auf Grund der Analyse des aus den Destillaten bereiteten Silbersalzes ausgeschlossen werden. Für das Auftreten nichtflüchtiger Säuren, wie Äpfelsäure, Fumarsäure, Milchsäure, lieferte die Untersuchung des Ätherextraktes der Kulturflüssigkeit keinen Hinweis; es fanden sich darin wenige Krystalle, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von 178° zeigten (Bernsteinsäure Smp. = 183—185°), eine positive Fichtenspanreaktion gaben, deren Mengen jedoch zum Umkrystallisieren und zur Elementaranalyse nicht ausreichten. Wenn hierdurch das Auftreten von Bernsteinsäure wahrscheinlich gemacht ist, so spricht die Ausbeute dagegen, daß diese Substanz im vorliegenden Falle ein wesentliches Abbauprodukt der Asparaginsäure darstellt.

Auf Grund dieser Ergebnisse war zu erwarten, daß die Hauptmenge der desaminierten Asparaginsäure sich in Form von Kohlensäure wiederfindet, und daß es durch eine quantitative Bestimmung der von den Kulturen abgegebenen und der gebundenen Kohlensäure gelingen muß, die Bilanz des Kohlenstoffes vollkommener zu erfassen. Die Methode, die wir bei unseren Untersuchungen benutzt haben, ist bereits (sub II) beschrieben worden.

Versuch 7.

100 ccm Kulturflüssigkeit enthalten: 0,5 g NaCl, 0,1 g KCl, 10 ccm $^{m}/_{15}$-Phosphatpuffer, 5 ccm m-Natrium-Asparaginatlösung. p_H = 7,5.

Die Nährlösung wurde mit einer Öse einer Abschwemmung von Cholera Kowno I (24stündiger Agarkultur) beimpft.

Zur Untersuchung wurden 5 ccm der beimpften Kulturflüssigkeit in das kleine U-förmige Züchtungsrohr einpipettiert, nachdem zuvor 15 ccm $^{n}/_{10}$-HCl in das Péligot-Rohr und 15 ccm Ba $(OH)_2$ in den Kohlensäureabsorptionsapparat eingebracht worden waren (der Titer des Barytwassers = 0,046 n). Die Geschwindigkeit des Luftstromes in der vorher von CO_2 befreiten Apparatur wurde derart reguliert, daß pro Stunde 400—500 ccm kohlensäurefreie Luft die Apparatur passierte. Nach bestimmten Zeiten wurde der Inhalt der Barytwasservorlage erneuert und die Menge der gebildeten Kohlensäure austitriert.

Freie Kohlensäure:

Nach	45 Stunden finden sich	11,5 mg CO_2	= 3,13 mg C
nach weiteren	20 „ „ „	7,61 „ „	= 2,08 „ C
„ „	26 „ „ „	6,25 „ „	= 1,70 „ C
„ „	24 „ „ „	0 „ „	
	Gesamtmenge	**25,36 mg CO_2**	**= 6,91 mg C.**

Gebundene Kohlensäure: Nachdem die freie CO_2 restlos ausgetrieben worden ist, wird die Kultur mit 5 ccm $^n/_5$-HCl angesäuert. In der (sich erneut trübenden) vorgelegten Barytlauge werden titrimetrisch festgestellt: **5,59 mg CO_2 = 1,52 mg C.** Insgesamt sind somit **30,95 mg CO_2 = 8,43 mg C aus der Nährlösung entstanden.**

Ammoniakbestimmung:

vorgelegt 15,0 ccm $^n/_{10}$ HCl
wiedergefunden 12,6 „
NH_3 = 2,4 ccm $^n/_{10}$ = 2,4 · 1,7 = **4,08 mg NH_3**
= **3,36 mg N.**

In der umgesetzten Kulturlösung selbst ist kein gebundenes Ammoniak nachzuweisen, *Nessler* negativ.

5 ccm der Nährlösung enthielten ursprünglich 33,25 mg Asparaginsäure, die einem Gehalt von 3,5 mg Stickstoff und 12,0 mg Kohlenstoff entsprechen. Nach der Umsetzung durch die Choleravibrionen werden am 5. Tage von 3,5 mg Aminosäure-N **3,36 mg = 96%** als NH_3-N wiedergefunden. Die Asparaginsäure ist somit zu 96% aufgespalten worden.

Der Kohlenstoffgehalt der stickstofffreien Spaltprodukte berechnet sich zu 11,52 mg. In Form von Kohlensäure wurden 8,43 mg Kohlenstoff = 73,1% nachgewiesen. Eine Bestimmung der flüchtigen Säuren kam bei der geringen umgesetzten Menge nicht in Frage. Auf jeden Fall ergibt sich, daß die Hauptmenge der desaminierten Asparaginsäure eine Umwandlung in Kohlensäure erfährt.

Versuch 8.

100 ccm Kulturflüssigkeit enthalten 0,5 g NaCl, 0,1 g KCl, 10 ccm $^m/_{15}$-Phosphatpuffer, 0,646 g Asparaginsäure.

Die Kulturlösung wurde in einer 200 ccm fassenden ventilierbaren Zuchtröhre sterilisiert, sodann an die Durchlüftungsapparatur angeschaltet und erst nach gründlicher Durchspülung der Apparatur mit CO_2-freier Luft von dem seitlichen Tubus aus beimpft. Das vorgelegte Péligot-Rohr wurde mit 10 ccm n-Salzsäure beschickt. Die von der Kultur entwickelte Kohlensäure wurde gravimetrisch bestimmt.

Bakterienvermehrung: (Die Entnahme der Proben geschah durch den seitlichen Tubus nach Herstellung eines Druckausgleiches mit der Außenluft durch Lösen der Verbindung zum Aspirator.)

Nach Stunden		Keimzahl
Einsaat[1])	0	$9,4 \cdot 10^5$
„	15	$1,0 \cdot 10^8$
„	24	$6,3 \cdot 10^9$
„	41	$6,0 \cdot 10^8$
„	80	$1,0 \cdot 10^8$
„	112	$1,7 \cdot 10^7$
„	136	$1,9 \cdot 10^5$
„	160	steril

Die Bestimmung der Gewichtszunahme der Kalischraubenapparate ergab die Menge der entwickelten CO_2.

Freie Kohlensäure:

Wägung Nr.	In Stunden	Aus 100 ccm Kultur CO_2 g
1	41	$0,159_7$
2	25	$0,076_9$
3	23	$0,087_9$
4	23	$0,073_1$
5	24	$0,038_2$
6	24	$0,028_8$
	In 160 Stunden	$0,464_6$ g CO_2.

Die Bestimmung der gebundenen Kohlensäure wurde infolge eines technischen Mißgeschicks nicht durchgeführt.

Bestimmung des freien Ammoniaks: Die Titration der vorgelegten Säure ergibt eine Differenz von 13,2 ccm $^n/_{10}$ NaOH = 13,2 · 1,7 = **22,4 mg NH_3.**

Bestimmung des gebundenen Ammoniaks: 41,7 ccm Kultur werden auf 100 ccm aufgefüllt. 45 ccm (= 18,7 ccm der Urlösung) = 4,32 $^n/_{10}$ NH_3 = 7,34 mg NH_3. 100 ccm Kultur = **39,2 mg NH_3.**

Gesamtammoniak aus 100 ccm Kultur = 22,4 mg
39,2 mg
61,6 mg

Formoltitration der noch vorhandenen Asparaginsäure:
39,6 ccm Kultur = 2,85 ccm $^n/_{10}$ NaOH
= 2,85 · 13,3 mg = 37,9 mg Asparaginsäure.

100 ccm Kultur = 95,7 mg Asparaginsäure.

Von 646 mg Asparaginsäure sind $\frac{100 \cdot (646-95,7)}{646} = 85,1\%$ umgesetzt.

C- *und* N-*Bilanz:*

Angesetzt 0,646 g Asparaginsäure
Umgesetzt $0,550_3$ g Asparaginsäure = 85,1%.
$0,550_3$ g Asparaginsäure = 0,198 g C
= 0,057 g N.

In freie CO_2 *umgesetzt:* CO_2 = 0,464 g = 0,1265 gC = 63,8%.

In NH_3 *umgesetzt:* NH_3 = 0,0616 g = $0,050_7$ gN = 88,9%.

[1]) Aus einer 24stündigen Asparaginsäurekultur (24. Passage).

Versuch 9.

1 l Mineralsalzlösung enthält 5 g NaCl, 1 g KCl, 100 ccm $^{m}/_{15}$-Phosphatpuffer. $p_H = 7,5$.

490 ccm Mineralsalzlösung werden zusammen mit 4,425 g Natrium asparaginicum in einer großen Züchtungsröhre sterilisiert. Das Gefäß wird an die Apparatur angeschlossen. In das Péligot-Rohr werden 20 ccm 2,46 n-HCl einpipettiert. Der Aspirator wird in Betrieb gesetzt; nachdem die Gewichtskonstanz der Kaliapparate festgestellt ist, wird die Nährlösung mit 10 ccm einer Abschwemmung von einer 24stündigen Vibrionenkultur auf Agar beimpft. Die Kaliapparate werden nach je 24 Stunden gegen andere ausgetauscht, und das Gewicht der freien Kohlensäure wird bestimmt.

Quantitative Ermittlung der freien CO_2:

	g Kohlensäure	mg Kohlensäure pro die (Durchschnittswerte)
1. Woche	$0,919_1$	131,3
2. „	$0,606_7$	86,7
3. „	$0,395_0$	56,4
4. „	$0,245_4$	35,0
freie CO_2 = $2,166_2$ g		

Nach Ansäuern der Kultur mit 90 ccm verd. HCl wird die *gebundene Kohlensäure* ausgetrieben und nach Absorption gewogen.

Gebundene CO_2 = 1,048 g
Gesamt-CO_2 = 3,214 g

Bestimmung des flüchtigen Ammoniaks:

Die Titration der vorgelegten Salzsäure ergibt eine Differenz von 4,2 ccm n-NaOH = $4,2 \cdot 0,017 = 0,0714$ g NH_3.

Bestimmung des gebundenen Ammoniaks und Formoltitration der nicht umgesetzten Aminosäure:

NH_3: (nach *Krüger* und *Reich*):

a) 45 ccm Kultur (= 38,1 ccm der ursprünglichen Nährlösung) = 13,1 ccm $^{n}/_{10}$ NH_3
b) 45 ccm Kultur = 12,5 ccm $^{n}/_{10}$ NH_3
Mittelwert = 12,8 ccm $^{n}/_{10}$ NH_3 = 21,7 mg NH_3

In 590 ccm Kultur (= 500 ccm Urlösung) = $0,284_5$ g NH_3.

Gesamtammoniak = $0,071_4$
+ $0,284_5$
= **$0,355_9$ g NH_3**

Formoltitration (nach *Sörensen*):

a) 45 ccm Kultur (=38,1 ccm Urlösung) = 1,80 ccm $^{n}/_{10}$ NaOH
b) 45 ccm Kultur = 1,85 ccm $^{n}/_{10}$ NaOH
Mittelwert = 1,825 ccm $^{n}/_{10}$ NaOH
= $1,825 \cdot 17,7$
= 0,0323 g Na-asp.

In 590 ccm Kultur sind $0,423_5$ g Na-asparag. enthalten.
Von 4,425 g Na-asparag. sind 4,002 = **90,4%** umgesetzt.

Bestimmung der flüchtigen Säuren:

450 ccm (= 381 ccm Urlösung) werden über H_3PO_4 im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Die Gesamtmenge der flüchtigen Säuren

$$= 5{,}67_8 \text{ ccm n-Säure}$$
$$= 5{,}67_8 \cdot 0{,}06 \text{ g} = 0{,}3406 \text{ g Essigsäure.}$$

In 590 ccm Kultur sind $0{,}3406 \cdot \frac{590}{450} =$ **$0{,}446_5$ g CH_3COOH** gebildet.

C- *und* N-*Bilanz:*

Angesetzt : 4,425 g Na-asparag. = 3,325 g Asp.-Säure
Umgesetzt : 4,002 g = 90,4% = 3,005 g Asp.-Säure
3,005 g Asparaginsäure = **1,084 g C**
= **0,316 g N**

Kohlenstoffhaltige Endprodukte:

CO_2	= 3,214 g	= 0,876 g C	= 80,8% des umges. C
$CH_3 \cdot COOH$	= $0,446_5$ g	= 0,178 g C	= 16,4% des umges. C
Wiedergefundene C		= 1,054 g	= **97,2%** des umges. C

Stickstoffhaltige Endprodukte:

NH_3 = $0,355_9$ g = 0,293 g N = **92,7%** des umges. N.

Bakteriologische Kontrolle: Abstrich nach 6, 12 und 22 Tagen auf Agar ergeben Reinkulturen von Choleravibrionen.

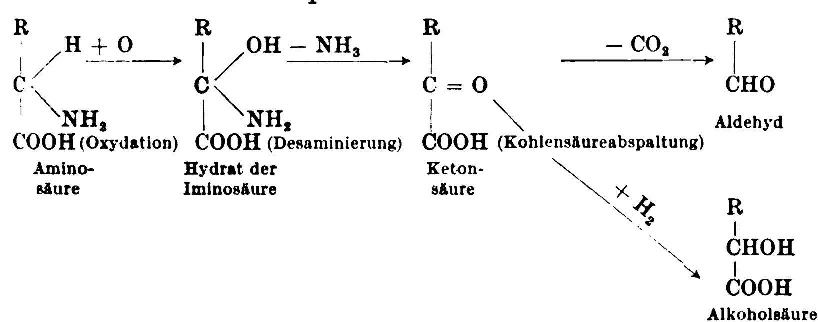
Die Geschwindigkeit der Umsetzung zeigte in den unter Ventilation durchgeführten Versuchen weitgehende Differenzen, obwohl die Zusammensetzung der Nährlösungen die gleiche war. Es wäre denkbar, daß die Intensität der Durchlüftung, die mit zunehmendem Volumen der Nährlösung geringer wurde, für die Geschwindigkeit der Stoffwechselvorgänge von Bedeutung ist; hierüber fehlen noch vergleichende Untersuchungen.

Aus den Versuchen 7—9 geht hervor, daß etwa 70—80% der Asparaginsäure nach erfolgter Abspaltung der Aminogruppe in Kohlensäure umgewandelt werden. Die Bilanz des Aminosäurestickstoffes erfaßt 90 und mehr in Form von *Ammoniak*; das Schicksal des im Asparaginsäuremolekül vorhandenen Kohlenstoffs wird ebenfalls in einem Umfang von 90% und mehr aufgeklärt: neben unwesentlichen Spuren von Bernsteinsäure werden *Essigsäure* und *Kohlensäure* in einem Verhältnis von annähernd 1 Mol $CH_3 \cdot COOH$: 8 Mol CO_2 gebildet.

Der Abbau der Asparaginsäure durch den Vibrio cholerae führt zu den gleichen Endprodukten, wie sie *P. Nawiasky* (l. c.) bei der Umsetzung dieser Aminosäure durch den *Bacillus proteus vulgaris* festgestellt hat. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in dem quantitativen Verhältnis der Enderzeugnisse, da die von Bacillus proteus in großen

Mengen produzierte Bernsteinsäure beim *Vibrio cholerae* auf geringe Spuren beschränkt bleibt. Die von den anderen Autoren aufgefundenen Produkte der bakteriellen Asparaginsäurezersetzung — wie Ameisensäure, Propionsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure — konnten wir im Falle des Choleraerregers nicht nachweisen, auch ließ die bilanzmäßige Zusammenstellung der von uns quantitativ ermittelten Substanzen wenig Raum für wesentliche Mengen andersartiger Verbindungen.

Wenn wir schließlich noch auf die theoretischen Vorstellungen eingehen, die im Anschluß an die verschiedenartigen experimentellen Ergebnisse der biochemischen Asparaginsäurespaltung entwickelt worden sind, so dürfen wir feststellen, daß bezüglich der ersten Phase der Desaminierung sowie hinsichtlich der zentralen Stellung der Ketobernsteinsäure beim weiteren Abbau des stickstofffreien Restes keine Meinungsverschiedenheiten bestehen. *O. Neubauer* und *K. Fromherz* (l. c.) haben in einer grundlegenden Arbeit „Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung" ein Schema der Aminosäurespaltung aufgestellt, auf das die später entwickelten Theorien mehr oder weniger bewußt zurückgegriffen haben. *Neubauer* und *Fromherz* wiesen darauf hin, daß die Desaminierung, die die Aufspaltung des Aminosäuremoleküls einleitet, einen oxydativen Vorgang darstellt, der zur Entstehung der Ketonsäure führt. Die Ketonsäure stellt den Ausgangspunkt der Reaktionsfolgen dar, die zu den verschiedenen Endprodukten des Abbaues verlaufen.



Die neuzeitliche Auffassung der Desaminierung als dehydrierenden Vorgang [siehe *C. Oppenheimer*: Die Fermente[1])] nimmt die gleichen Zwischenstufen der Umsetzung an. In dem speziellen Fall der Asparaginsäure führt die oxydative Desaminierung zur Ketobernsteinsäure (Oxalessigsäure). An dieser Substanz vollzieht sich sodann entweder eine *Reduktion* oder eine *Decarboxylierung*.

Die meisten der bei der bakteriellen *Fäulnis*, bei der Einwirkung von *B. fluorescens* und *B. pyocyaneus* erhaltenen Umsetzungsprodukte dürften auf dem Wege einer fortschreitenden Reduktion entstanden sein.

[1]) 5. Aufl., Leipzig 1925, S. 796.

Die erste Stufe dieser Umwandlung führt zur Äpfelsäure, die durch weitere Reduktion in Bernsteinsäure übergehen kann. Die Entstehung der Fumarsäure erklärte *Blanchetière* (l. c.) durch die Reduktion der der Ketobernsteinsäure entsprechenden Enolform:

$$HOOC \cdot CH : C(OH) \cdot COOH + H_2 = HOOC \cdot CH : CH \cdot COOH + H_2O$$

Den reduktiven Abbau der Asparaginsäure hat *Supniewski* (l. c.) auf Grund der von *Neuberg*, von *Aubel* und von *Blanchetière* entwickelten Vorstellungen in folgende Formulierung zusammengefaßt:

$$\begin{array}{l} CH(NH_2) \cdot COOH \\ | \\ CH_2COOH \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CO \cdot COOH \\ | \\ CH_2COOH \end{array} \begin{array}{l} \nearrow \begin{array}{l} CHOH \cdot COOH \\ | \\ CH_2 \cdot COOH \\ \text{(Äpfelsäure)} \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_2 \cdot COOH \\ | \\ CH_2 \cdot COOH \\ \text{(Bernsteinsäure)} \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH_2 \cdot COOH \\ \text{(Propionsäure)} \end{array} \\ \searrow \begin{array}{l} CH \cdot COOH \\ \| \\ CH \cdot COOH \\ \text{(Fumarsäure)} \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} H \cdot COOH \\ \text{(Ameisensäure)} \end{array} \end{array}$$

Der zweite Weg der Aminosäurespaltung führt durch Decarboxylierung zu der Reihe mit der nächst niederen Zahl von Kohlenstoffatomen. In dieser Richtung bewegt sich der Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung und im Tierkörper [*Felix Ehrlich*[1]), *Otto Neubauer* und *K. Fromherz* (l. c)]. Nach den Vorstellungen von *O. Neubauer* müßte aus der Oxalessigsäure die Formylessigsäure hervorgehen. Diese Substanz ist so unbeständig, daß sie bei dem Versuche einer präparativen Darstellung[2]) sofort in CO_2 und Acetaldehyd zerfällt. Dem entspricht auch die von *Neuberg* und *L. Karczag*[3]) beobachtete Vergärung der Oxalessigsäure zu 1 Mol Acetaldehyd und 2 Mol CO_2. Auf diesem Wege dürfte auch die von uns bei der Aufspaltung der Asparaginsäure durch den Vibrio cholerae vorgefundene *Essigsäure* entstanden sein, indem der Acetaldehyd einer weiteren Oxydation unterzogen wird.

$$\begin{array}{l} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ C = O \\ | \\ COOH \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \left[\begin{array}{l} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHO \end{array} \right] \\ + \\ \boxed{CO_2} \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} \boxed{CO_2} \\ + \\ CH_3 \\ \cdot \\ CHO \end{array} + O \rightarrow \boxed{\begin{array}{l} CH_3 \\ \cdot \\ COOH \end{array}}$$

---

1) Biochem. Zeitschr. **2**, 52. 1906; Ber. d. dtsch. chem. Ges. **39**, 4072; **40**, 1027. 1907.

2) Siehe *V. Meyer* und *P. Jacobson*, Lehrbuch der organischen Chemie. Leipzig 1913, Bd. I, 2. Teil, S. 1095.

3) Biochem. Zeitschr. **36**, 72. 1911.

Entsprechend dieser Reaktionsfolge müßte Essigsäure und Kohlendioxyd in einem Verhältnis von 1 Mol $CH_3 \cdot COOH$: 2 Mol CO_2 aus der Umsetzung der desaminierten Asparaginsäure hervorgehen. Das Auftreten von etwa 8 Mol CO_2 auf 1 Mol Essigsäure zeigt, daß ein erheblicher Teil des Asparaginsäuremoleküls durch den Vibrio cholerae restlos verbrannt wird. Ob die Oxydation lediglich das Produkt des carboxylatischen Zerfalls (die Essigsäure) erfaßt, oder ob sie in den anderen Weg Weg der — reduktiven — Umsetzung eingreift und durch Verbrennung der Abbaustufen die Spuren dieser Reaktionsfolge völlig verwischt, läßt sich nicht entscheiden.

Der Abbau der Asparaginsäure durch den Vibrio cholerae stellt einen oxydativen Stoffwechselprozeß dar.

C. Die Umwandlung der Glucose durch den Vibrio cholerae.

Die vielfache Verwendung zuckerhaltiger Nährböden in der bakteriologischen Praxis hat es mit sich gebracht, daß auch über das Verhalten der Choleraerreger gegenüber den Kohlenhydraten zahlreiche biologische und biochemische Erfahrungen vorliegen. Schon frühzeitig nach seiner Entdeckung hat man den Vibrio cholerae als einen kräftigen „Säurebildner" erkannt [*H. Bitter*[1]), *S. Kitasato*[2]), *Nencki* u. a.]. Die Art und die Menge der aus Traubenzucker gebildeten Säuren sind von *J. Kuprianow*[3]) und insbesondere von *B. Gosio*[4]) näher untersucht worden. Es wurde festgestellt, daß der V. cholerae bei der Umsetzung von Glucose linksdrehende Milchsäure bildet. Die Fraktion der flüchtigen Säuren soll regelmäßig Buttersäure und Essigsäure enthalten; daneben wurde das Auftreten von Alkohol und aldehydartigen Substanzen festgestellt. Diese Beobachtungen beziehen sich auf glucosehaltige Peptonwasserkulturen. Bei einer Versuchsreihe mit der von *Uschinsky* angegebenen Nährlösung sind Untersuchungen über die Art der flüchtigen Säuren nicht durchgeführt worden. Die quantitative Auswertung der entstandenen Abbauprodukte geschah durch analytische Methoden, deren Genauigkeit *Gosio* selbst als unzureichend bezeichnet.

Die Choleravibrionen sind imstande, auch die Polysaccharidverbindungen in ihrem Stoffwechsel zu verwerten. *C. Lange*[5]) und *H. Kodoma*[6]) haben die diastatische Fähigkeit der Choleraerreger gegenüber Stärke zur elektiven Züchtung und praktischen Diagnose herangezogen. *Julien Dumas*[7]) beobachtete, daß Choleravibrionen in flüssigen Medien Glykogen unter Bildung von Maltose und Glucose hydrolysieren. Die Tatsache, daß die Choleraerreger hochmolekulare Zucker zu zerlegen imstande sind, deutet — teleologisch betrachtet — darauf hin, daß die Kohlehydrate zu den „natürlichen" Nährstoffen dieser Mikroorganismen gehören. Der Befund *Lemoignes*[8]), daß sich bei der Umsetzung von Kohlenhydraten Butylenglykol findet, zeigt, daß die Choleravibrionen in gleicher

1) Arch. f. Hyg. **5**, 249. 1886.
2) Zeitschr. f. Hyg. **5**, 491. 1889.
3) Arch. f. Hyg. **19**, 282. 1893.
4) Arch. f. Hyg. **22**, 1. 1893.
5) Dtsch. med. Wochenschr. **41**, 1119. 1915.
6) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **88**, 433. 1922.
7) Compt. rend. de la soc. de biol. **82**, 547. 1919.
8) Compt. rend. de la soc. de biol. **83**, 336. 1920.

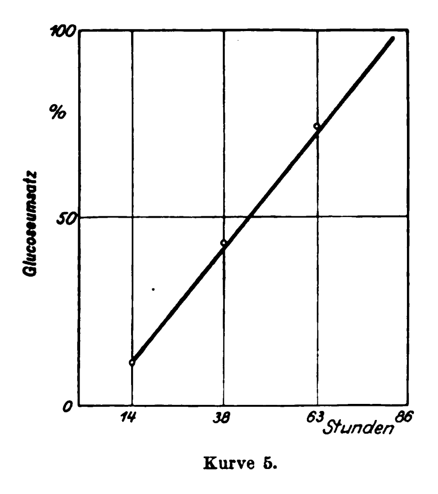
Weise wie die Hefezellen [*J. Hirsch*[1])] aus intermediär auftretendem Acetaldehyd Körper der Vier-Kohlenstoffreihe aufzubauen vermögen. Außer den eingangs erwähnten Untersuchungen von *Gosio* liegen keine genaueren chemischen Befunde über die Endprodukte und über den Umsatz des Traubenzuckers durch den V. cholerae vor.

Eine so einfache Versuchsanordnung, wie sie für die Ermittlung des Asparaginsäureabbaues möglich war, läßt sich für die Feststellung der Glucosespaltung durch den V. cholerae nicht verwirklichen, da dieser Erreger nicht imstande ist, seinen Stickstoffbedarf aus anorganischen N-Quellen (Ammoniaksalzen, Nitraten) zu decken. Die Erfahrung, daß die Choleraerreger den Stickstoff der Asparaginsäure zum Aufbau ihrer Leibessubstanz auszunützen vermögen, wies uns darauf hin, diese Substanz, deren Schicksal im Stoffwechsel der Choleravibrionen durch die im vorhergehenden Kapitel dargestellten Ergebnisse hinlänglich geklärt ist, als Stickstoffspender bei den Umsetzungen des Traubenzuckers zu verwenden. Die nachfolgenden Versuche, in denen der Umfang der Traubenzuckerspaltung, der zeitliche Verlauf dieser biochemischen Reaktion sowie die daraus entstandenen Endprodukte analytisch ermittelt wurden, sind auf Nährlösungen durchgeführt worden, die an organischen Substanzen *ausschließlich Traubenzucker* und *Asparaginsäure* enthielten.

Versuch 10.

Die Mineralsalzlösung enthält 0,2% KCl, 0,3% NaCl, 0,02% $MgSO_4$, 10 ccm einer $^{m}/_{15}$-Phosphatpuffer-Lösung in 100 ccm. $p_H = 7,7$.

Zu 650 ccm dieser Mineralsalzlösung werden 14 ccm m-Na-asparaginatlösung und 45 ccm einer (etwa 25 proz.) Traubenzuckerlösung hinzugegeben. Die Bestimmung des Zuckers wurde nach *Pavy* und *Kumagawa*[2]) durchgeführt. Anfänglicher Zuckergehalt = 1,602%. 300 ccm der Kulturlösung werden mit 10 g $CaCO_3$ versetzt, mit einer Abschwemmung einer 24stündigen Agarkultur von Kowno I beimpft und bei 37° bebrütet.



Kurve 5.

Zuckerumsatz:

Nach Stunden	enthalten 100 ccm Kultur g Hexose	Umsatz in %
0	1,602	—
14	1,414	11,7
38	0,9058	43,4
63	0,3888	75,7
86	< 0,16	> 90,0

Die graphische Darstellung des Zuckerumsatzes (Kurve 5) zeigt einen geradlinigen Verlauf.

[1]) Biochem. Zeitschr. **131**, 178. 1922.

[2]) Salkowski-Festschrift, Berlin: Hirschwald 1904, S. 211.

In den folgenden Versuchen wird das Verhalten des Zuckerabbaues bei Abwesenheit und bei Gegenwart des säurebindenden Calciumcarbonats verfolgt.

Versuch 11.

Die Kulturflüssigkeit enthält an Mineralsalzen 0,35% NaCl, 0,08% KCl, 0,02% $MgSO_4$, $^m/_{60}$-Phosphat %.

Als C- und N-Quellen dienen 0,972 proz. Traubenzucker, 0,28 proz. Na-asparaginat.

Ansatz A. 275 ccm Nährlösung werden **mit 3 g $CaCO_3$** versetzt und mit Cholera Kowno I beimpft.

Ansatz B. 275 ccm werden **ohne Zusatz von $CaCO_3$** in gleicher Weise wie A beimpft.

Nach Stunden	100 ccm Kultur A enthalten Traubenzucker	Umsatz	100 ccm Kultur B enthalten Traubenzucker	Umsatz
48	0,4340 g	55,3%	0,7183 g	26,1%
96	0,0 g	100%	0,7142 g	26,5%

Nach 48 Stunden zeigt Ansatz B völlige Keimfreiheit, während ein Abstrich von Ansatz A zu einer Cholerareinkultur heranwächst.

Endliche H-Ionenkonzentration : A. $p_H = 7{,}0$; B. $p_H = 5{,}9$.

Versuch 12.

Die Kultur enthält 0,5% NaCl, 0,02% $MgSO_4$, 0,2% K_2HPO_4.

An organischen Substanzen: 0,3 proz. Na-asparaginat, 1,064 proz. Traubenzucker.

Ansatz A. 100 ccm Nährlösung + **2 g sterilisiertes Calciumcarbonat,** beimpft mit Cholera Kowno I.

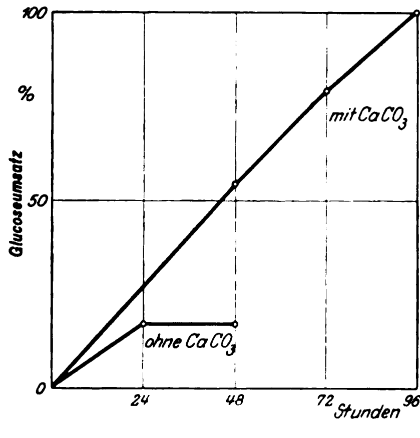
Ansatz B. 100 ccm **ohne Zusatz von $CaCO_3$,** beimpft mit Cholera Kowno I.

Nach Stunden	100 ccm Kultur A enthalten Traubenzucker	Umsatz	100 ccm Kultur B enthalten Traubenzucker	Umsatz
24	—	—	0,877 g	17,6%
48	0,487 g	54,2%	0,877 g	17,6%
72	0,227 g	78,6%	—	—
96	0,0 g	100%	—	—

Siehe auch Kurve 6.

Nach 48 Stunden zeigte Ansatz B bei der bakteriologischen Kontrolle absolute Sterilität, während ein Abstrich von Ansatz A eine üppigwachsende Reinkultur von Vibrionen ergab. Nach 96 Stunden betrug bei A $p_H = 7{,}1$; bei B $p_H = 5{,}4$.

Die qualitative chemische Prüfung von Ansatz A wies auf die Anwesenheit von Milchsäure (*Fletscher-Hopkins* +++) und von flüchtigen organischen Säuren hin.



Kurve 6.

In weiteren Versuchen sollte durch Erhöhung der Konzentration des Phosphatpuffers die extreme Säuerung der Kultur aufgehoben werden.

Versuch 13.

100 ccm einer $^m/_{30}$-*Phosphatlösung* von $p_H = 7{,}8$, die an Salzen 0,2% KCl, 0,3% NaCl, 0,02% $MgSO_4$ enthält, werden mit 4 ccm einer $^m/_2$-Na-asparaginatlösung und 2,5 ccm einer 40proz. Traubenzuckerlösung versetzt. Beimpft mit Cholera Kowno I.

Nach 24stündigem Verweilen im Brutschrank zeigt sich eine starke Trübung, mikroskopisch findet sich eine Reinkultur von Choleravibrionen.

Nach 48 Stunden sind 63,6% des Zuckers verschwunden; $p_H = 5{,}7$. Nach 96 Stunden finden sich die gleichen Zahlen für den Zuckerumsatz; $p_H = 5{,}7$.

Fletscher-Hopkins' Reaktion auf Milchsäure +.

Plattenabstrich wächst nicht an.

Versuch 14.

190 ccm einer $^m/_3$-*Phosphatlösung* von $p_H = 7{,}8$ enthalten 0,2% KCl, 0,3% NaCl, 0,02% $MgSO_4$.

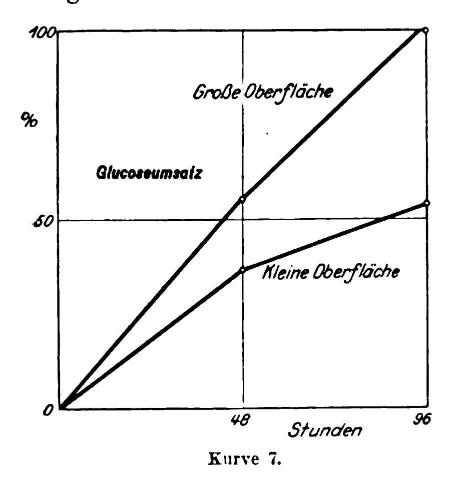
Es werden hinzugegeben: 7,6 ccm einer $^m/_2$-Na-asparaginatlösung und 5 ccm einer 40proz. Traubenzuckerlösung.

Nach 48 Stunden zeigt die Kultur nur eine geringe Trübung.

Plattenabstrich zeigt spärliches Wachstum von Choleravibrionen. $p_H = 7{,}8$.

Eine Erhöhung der Phosphatpufferkonzentration auf $^m/_{30}$ langt nicht aus, um die aus der Hexose entstehenden Säuren zu puffern; bei $^m/_3$ Phosphatkonzentration tritt eine starke Hemmung des Wachstums auf.

Über den Einfluß des Luftsauerstoffs auf den Zuckerumsatz gibt der folgende Versuch Aufschluß.



Kurve 7.

Versuch 15.

Die Nährlösung enthält an Salzen 0,35% NaCl, 0,08% KCl, 0,02% $MgSO_4$, $^m/_{60}$-Phosphat-%.

An organischen Substanzen: 0,972 proz. Traubenzucker, 0,28 proz. Na-asparaginat.

Je 275 ccm der Nährlösung werden nach Zusatz von 3 g Calciumcarbonat mit einigen Tropfen einer Abschwemmung von einer 24stündigen Cholera-Agarkultur gleichmäßig beimpft.

In Erlenmeyer-Kolben (in hoher Schicht) bebrütet, zeigen beide Ansätze (A und B) nach 18 Stunden einen Zuckergehalt von 0,868%.

Der Umsatz beträgt somit 10,7%. Der Inhalt des Kolbens A wird sodann in einen weitbauchigen Kolben umgefüllt, um der Kultur eine größere Oberfläche gegen den Luftsauerstoff zu bieten.

Nach Stunden	100 ccm Kultur B enthalten Traubenzucker	Umsatz	100 ccm Kultur B enthalten Traubenzucker	Umsatz
48	0,434 g	55,3%	0,6127 g	37,0%
96	0,0 g	100%	0,431 g	55,6%

Bei mangelndem Luftzutritt[1]) wird der Umsatz des Traubenzuckers deutlich gehemmt (s. Kurve 7).

Die folgenden Versuche dienen der Bestimmung bzw. der Identifizierung der aus der Glucose entstehenden Stoffwechselendprodukte.

Nachweis und Bestimmung des Äthylalkohols.

Versuch 16.

Die Kulturflüssigkeit enthält an Mineralsalzen: 0,5% NaCl, 0,2% K_2HPO_4, 0,02% $MgSO_4$.

Zu 950 ccm dieser Mineralsalzlösung werden 16,6 ccm m-Na-asparaginatlösung und 50 ccm einer etwa 20proz. Traubenzuckerlösung hinzugegeben; die Zuckerbestimmung zeigt einen Gehalt von 1,02% Traubenzucker an. $p_H = 7,6$. Die mit einer Aufschwemmung von Choleravibrionen beimpfte Kultur wird in 2 Portionen geteilt, die mit je 20 g Calciumcarbonat versetzt und in Fernbach-Kolben bei 37° bebrütet werden.

Nach 96 Stunden ist der Zucker restlos umgesetzt (Fehlingsche Reaktion negativ).

Alkoholbestimmung: 293 ccm der klar filtrierten Kultur werden über Calciumcarbonat destilliert, bis etwa $^2/_3$ übergegangen sind. Das Destillat wird angesäuert und wiederum der Destillation unterworfen. Die Einengung des nunmehr von flüchtigen Säuren und Basen befreiten Destillates wird so lange fortgesetzt, bis ein Volumen von 27,5 ccm erreicht ist. Das Destillat zeigt eine *positive Jodoformreaktion*; die *Rimini*sche Reaktion auf Aldehyde fällt negativ aus. Die pyknometrische Bestimmung des spezifischen Gewichtes ergibt : 0,9988. Der Alkoholgehalt des Destillates beträgt 0,5% (Gewicht). 27,5 ccm Destillat enthalten demnach 0,1375 g Alkohol. In der dem Destillate zugrunde liegenden Kulturflüssigkeit (293 ccm) waren 2,98 g Glucose umgesetzt. *Aus 100 g Hexose sind 4,6 g Alkohol hervorgegangen.*

Identifizierung der flüchtigen Säuren.

Versuch 17.

2000 ccm Kulturflüssigkeit enthalten 10 g NaCl, 4 g K_2HPO_4, 0,4 g $MgSO_4$, 6,0 g Na-asparag., 24,74 g Traubenzucker.

Die Nährlösung wird mit 35 g $CaCO_3$ angesetzt. $p_H = 8,4$.

---

[1]) *Anmerkung bei der Korrektur:* Die Hemmung des Zuckerumsatzes in hoher Schicht dürfte nach neueren Ergebnissen weniger auf den mangelnden Luftzutritt, als auf den herabgesetzten Ausgleich der Säuerung zurückzuführen sein.

Einsaat: 7,2 · 10^5 Cholera Kowno I pro Kubikzentimeter.

Keimzahl nach 24 Stunden: 1,6 · 10^8.

Zuckerumsatz: nach 48 Stunden — 20%; nach 120 Stunden — 49,5%.

Die flüchtigen Säuren werden im Vakuum mit Wasserdampf unter Zusatz von H_3PO_4 abdestilliert. Das Destillat wird mit chlorfreier Natronlauge alkalisiert und eingedampft. Der Rückstand wird wiederholt mit Alkohol extrahiert, wobei die alkoholunlöslichen Salze abfiltriert werden. Nach Verjagen des Alkohols wird die zurückbleibende Salzmasse in wenig Wasser aufgenommen. Eine kleine Probe, mit HNO_3 angesäuert und mit konz. Silbernitratlösung versetzt, ergibt einen käsigen Niederschlag, der sich sehr schnell schwärzt. Diese Reduktion des Silbersalzes beweist die Gegenwart von *Ameisensäure.*

Die Hauptmenge des alkohollöslichen Salzrückstandes wird nach dem Verfahren von *W. Brasch* und *C. Neuberg*[1]) mit Mercurisulfat in schwefelsaurer Lösung am Rückflußkühler erhitzt, wodurch die vorhandene Ameisensäure restlos zerstört wird. Nach dem Erkalten wird von dem unlöslichen Quecksilbersalzen abfiltriert und der Niederschlag gut ausgewaschen. Die umständliche Entfernung der in Lösung gegangenen Quecksilbersalze haben wir dadurch umgangen, daß wir die schwefelsaure Lösung einer nochmaligen Destillation im Vakuum unterworfen haben. Die vereinigten Destillate werden mit NaOH neutralisiert und auf dem Wasserbade eingeengt. Der Salzrückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen und nach Ansäuern mit verdünnter HNO_3 mit einer konz. Lösung von Silbernitrat versetzt. Es fällt ein käsiger, schneeweißer Niederschlag aus, der sofort abgenutscht wird. Nach dem Trocknen im Exsiccator wird der Silbergehalt in zwei Portionen bestimmt.

a) 0,1733 g Substanz ergeben 0,1099 g Ag = 63,42%

b) 0,1987 g Substanz ergeben 0,1277 g Ag = 64,27%.

Berechnet für $AgOOC \cdot CH_3$ Ag = 64,66%.

Die Fraktion der flüchtigen Säuren besteht ausschließlich aus Ameisensäure und Essigsäure.

Quantitative Ermittlung der flüchtigen Säuren und der Milchsäure.

Versuch 18.

Die Nährlösung enthält an Mineralsalzen 0,5% NaCl, 0,2% K_2HPO_4, 0,02% $MgSO_4$, 2,0% $CaCO_3$.

An organischen Substanzen: 0,26% Asparaginsäure, 1,864% Traubenzucker.

Es werden 2 Kulturen (A und B) von etwa 300 ccm, die gleichmäßig mit Cholera Kowno I beimpft sind, 8 Tage bei 37° bebrütet.

In 100 ccm Flüssigkeit finden sich nach dieser Zeit

bei Ansatz A 0,500 g Hexose; umgesetzt demnach 73,2%;

„ „ B 0,520 g „ ; „ „ 72,1%.

[1]) Biochem. Zeitschr. **13**, 299. 1908.

Aufarbeitung:

Ansatz A. Fraktion der flüchtigen Säuren 200 ccm filtrierte Kultur werden unter Zusatz von 30 ccm Phosphorsäure (D = 1,3) im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Gesamtsäure aus 200 ccm Kultur = 11,2 ccm n-Säure.

Aus *100 ccm Kulturflüssigkeit* gehen *5,6 ccm n-Säure* hervor. Die gesammelten Destillate werden auf 50 ccm eingedampft. Eine Probe hiervon mit Silbernitrat zersetzt, ergibt wieder eine momentane Reduktion des Silbersalzes. Die Fraktion der flüchtigen Säuren enthält somit *Ameisensäure.*

Zur Entfernung der Ameisensäure werden 25 ccm der eingeengten Fraktion mit 4 g Mercurisulfat und 20 ccm 20proz. Schwefelsäure 1/2 Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Der Niederschlag des Quecksilbersalzes wird abfiltriert und ausgewaschen. Entsprechend der Vorschrift von *Brasch* und *Neuberg* (l. c.) wird das in Lösung gegangene Quecksilbersalz durch Einleiten von H_2S entfernt. Das Quecksilbersulfid wird abfiltriert und der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft verjagt. Nunmehr werden die Sulfate durch Eintragen von 30 g Bariumhydroxyd niedergeschlagen und der Überschuß an Baryt wird durch Einleiten von CO_2 ausgefällt. Der gesamte Niederschlag wird abfiltriert und ausgewaschen; das Filtrat wird auf dem Wasserbade eingedampft. Der trockene Rückstand wird mit absolutem Alkohol aufgenommen, das Unlösliche abfiltriert und die alkoholische Lösung wieder eingedampft. Das Aufnehmen in Alkohol wird wiederholt, nach Verjagen des Alkohols wird der Rückstand nunmehr in wenig destilliertem Wasser gelöst. Das aus dieser Lösung bereitete Silbersalz ist schneeweiß und wird im Exsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Durch vorsichtiges Veraschen wird der Silbergehalt bestimmt:

a)		b)	
Substanz	= 0,1435 g	Substanz	= 0,1363 g
Ag	= 0,0946	Ag	= 0,0897
	= 65,92%		= 65,81%

Berechnet wird für $AgOOC \cdot CH_3$ — Ag = 64,66%.

(Der etwas höhere Wert des vorgefundenen Silbers ist auf eine geringe Verunreinigung mit Chloriden zurückzuführen.)

Die von Ameisensäure befreite Fraktion besteht somit ausschließlich aus *Essigsäure.*

Milchsäurebestimmung: Der bei der Destillation der flüchtigen Säuren zurückgebliebene Rückstand wird in einen Meßkolben übergeführt und zusammen mit dem zum Nachspülen verwendeten Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Der Rückstand zeigt eine stark positive Reaktion nach *Fletscher-Hopkins.* 100 ccm (= 66,6 ccm Kulturlös.) werden mit 20 ccm 50proz. Schwefelsäure versetzt. Der hierbei ausfallende Niederschlag wird abfiltriert und mit heißem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird nach *Ohlson*[1]) mit Amylalkohol extrahiert und der in Sodalösung aufgenommene Extrakt auf 50 ccm aufgefüllt. Die Milchsäurebestimmung wird in 25 ccm nach dem Verfahren von *Fürth* und *Charnass*[2]) aus-

[1]) Skandinav. Arch. f. Physiol. **35**, 231. 1916.

[2]) Biochem. Zeitschr. **26**, 199. 1910; s. auch *G. Riesenfeld*, Biochem. Zeitschr. **109**, 249. 1920.

geführt. 25 ccm Extrakt enthalten $0{,}225_2$ g Milchsäure. In 200 ccm Kulturflüssigkeit, in denen 2,728 g Hexose umgesetzt sind, werden somit 1,351 g Milchsäure festgestellt. *Aus 100 g Hexose entwickeln die Choleravibrionen 49,5 g Milchsäure.*

Ansatz B. Wird in gleicher Weise aufgearbeitet. In 100 ccm Kulturflüssigkeit werden *4,55 n-flüchtige Säure* gefunden. Die Milchsäurebestimmung ergibt *45,6 g Milchsäure aus 100 g Traubenzucker.*

Versuch 19.

1500 ccm der Mineralsalzlösung enthalten 7,5 g NaCl, 1,5 g KCl, 150 ccm $^1/_5$ mol Phosphatpufferlösung. $p_H = 8{,}4$.

Zu der Mineralsalzlösung werden 6 g Na-asparaginat hinzugesetzt. Je 740 ccm (Ansatz A und B) werden mit 10 g Calciumcarbonat sterilisiert und sodann mit 25 ccm einer sterilen 26 proz. Traubenzuckerlösung versetzt. Die Bestimmung des Zuckers ergibt:

für Ansatz A = 1,176%,
für Ansatz B = 1,179%.

Die Nährlösungen werden mit einigen Tropfen einer Abschwemmung von Choleravibrionen (von 24 stündiger Agarkultur) beimpft.

Der Umsatz des Zuckers wird in Ansatz A fortlaufend bestimmt.

Nach Stunden	finden sich in 100 ccm Kultur g Hexose	Umsatz %
0	1,176	—
29	1,024	12,9
48	0,710	39,6
76	0,500	57,5
140	0,166	85,9
	Ansatz B enthält:	
Nach 140 St.	0,203 g	82,8%

Die bakteriologische Untersuchung ergibt nach 6 Tagen in beiden Ansätzen eine Reinkultur von Choleravibrionen.

Bestimmung der flüchtigen Säuren:

Ansatz A. 500 ccm filtrierte Kulturlösung werden über H_3PO_4 im Vakuum mit Wasserdampf destilliert. Die in den einzelnen Destillaten titrimetrisch ermittelte Säure = 20,76 ccm n-Säure.

In 100 ccm Kultur A sind insgesamt 4,15 ccm n-(flüchtige) Säure gebildet.

Ansatz B. 680 ccm Kulturflüssigkeit werden wie A verarbeitet und ergeben an flüchtigen Säuren = 27,2 ccm n-Säure.

In 100 ccm Kultur B sind 4,00 ccm n-(flüchtige) Säure entstanden.

Von den Destillaten werden aliquote Mengen mit NaOH alkalisiert und eingedampft. Der beim Zusatz von $AgNO_3$ entstehende, schnell sich schwärzende Niederschlag zeigt die Anwesenheit von *Ameisensäure* an. Die HCOOH wird mit Mercurisulfat und Schwefelsäure zerstört und der Rückstand einer nochmaligen Destillation unterzogen.

Ansatz A. Nach Zerstörung der Ameisensäure werden aus einem Quantum, dem 18,24 ccm n-Säure (Gesamtsäure s. oben) entsprechen,

5,5 ccm n-Säure wiedergefunden. Der Anteil der Ameisensäure an der Gesamtmenge der flüchtigen Säuren entspricht demnach *69,8*%.

Ansatz B. Aus 25,4 ccm n-(Gesamt-)Säure werden nach Zerstörung der Ameisensäure 6,4 ccm wiedergewonnen. Der Anteil der Ameisensäure an der Gesamtmenge der flüchtigen Säuren = *74,8*%.

Das aus den Destillaten der Redestillation bereitete Silbersalz gibt in beiden Ansätzen den Ag-Wert der Essigsäure.

A: a) Substanz = 0,1936 g — b) Substanz = 0,1787 g
Ag = 0,1254 — Ag = 0,1156
= **64,77**% — = **64,69**%

B: a) Substanz = 0,1447 g — b) Substanz = 0,1653 g
Ag = 0,0936 — Ag = 0,1067
= **64,68**% — = **64,55**%

berechnet für AgOOC · CH_3 : Ag = 64,66% .

Milchsäurebestimmung:

Ansatz A. Der bei der Destillation der flüchtigen Säuren verbliebene Rückstand wird auf 500 ccm aufgefüllt. 100 ccm (=100 ccm ursprüngliche Kulturflüssigkeit) werden nach *Ohlson* mit Amylalkohol extrahiert. Der in Sodalösung aufgenommene Extrakt wird auf 100 ccm aufgefüllt. In je 25 ccm wird nach der Methode von *Fürth* und *Charnass* die Bestimmung der Milchsäure ausgeführt.

Analyse	in 25 ccm g Milchsäure	in 500 ccm Kultur = 5,05 g umgesetzter Hexose	aus 100 g Hexose entstehen g Milchsäure
a	0,1226	2,452	48,5
b	0,1210	2,420	47,9

Ansatz B. Der Rückstand der Säuredestillation wird auf 500 ccm aufgefüllt. 100 ccm (=136 ccm ursprüngliche Kulturflüssigkeit) werden mit Amylalkohol extrahiert. Die wässerige Lösung des milchsauren Salzes wird auf 100 ccm aufgefüllt. Milchsäurebestimmung in je 25 ccm.

Analyse	in 25 ccm g Milchsäure	in 680 ccm Kultur = 6,63 g umgesetzter Hexose	aus 100 g Hexose entstehen g Milchsäure
a	0,1545	3,090	46,6
b	0,1620	3,220	48,5

Zur *Identifizierung der Milchsäure* werden die von flüchtigen Säuren befreiten Rückstände der Vakuumdestillation im Perkolator mit Äther extrahiert. Nach Verjagen des Äthers verbleibt ein syrupöser, mit Krystallen durchsetzter Rückstand zurück, der in wenig Wasser aufgenommen wird. Die ungelösten Krystalle werden abfiltriert und zeigen nach dem Trocknen Smp. 175—176° (Bernsteinsäure? Die Menge ist so gering, daß eine Umkrystallisation nicht vorgenommen werden kann.) Die wässerige Lösung wird in üblicher Weise auf milchsaures Zink verarbeitet. Die schließlich erhaltenen Zinksalze werden bis zur Gewichtskonstanz an der Luft getrocknet.

Krystallwasserbestimmung:

Substanz 0,1275 g — Gewichtsabnahme nach Trocknen bei 110° 0,0164 g. *Krystallwasser* = 12,86% [berechnet für optisch-aktives $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2H_2O : H_2O = 12,89\%$].

Außer optisch-aktiver Milchsäure und den erwähnten minimalen Mengen einer krystallinischen Substanz, die höchstwahrscheinlich aus Bernsteinsäure besteht, konnten andere Produkte in der Fraktion nicht flüchtiger, wasserlöslicherSäuren (bzw.Kalksalze) nicht nachgewiesen werden. Die Aufarbeitung der unlöslichen Kalksalze (Bodenkörper der Kulturen), die nach Behandlung mit H_2SO_4 ausgiebig im Perkolator mit Äther extrahiert wurden, lieferte nach Verjagen des Äthers einen unwägbaren Rückstand.

Einige wesentliche Ergebnisse der bisher über den Kohlehydratumsatz des Vibrio cholerae ausgeführten Versuche sind in den nachfolgenden Übersichtstabellen zusammengefaßt.

I. Der Umfang des Glucose-Abbaus.

Versuch Nr.	Anfänglicher Glucosegehalt	Umgesetzt in		Mittlerer Umsatz pro Std. mg
		Std.	g	
10	1,602	86	1,500	17
11A	0,972	96	0,972	10
12A	1,064	96	1,064	11
15	0,972	96	0,972	10
16	1,020	96	1,020	10
17	1,237	120	0,612	5
18A	1,864	168	1,364	8
18B	1,864	168	1,344	8
19A	1,176	140	1,010	7
19B	1,179	140	0,976	7

Durchschnitt 9,3 mg/Std.

In 100 ccm einer Glucose-Asparaginsäurelösung werden nach dem durchschnittlichen Ergebnis von 10 Versuchen 9,3 mg Kohlehydrat pro Stunde umgesetzt. Abgesehen von den Versuchen Nr. 10 und Nr. 17, die (aus bisher nicht erkennbaren Gründen) von diesem Werte erheblich abweichen, zeigen die übrigen 8 Daten eine gute Übereinstimmung.

Um uns einen zahlenmäßigen Begriff von der Größe dieser Stoffwechselleistung zu machen, nehmen wir den extremsten Fall an und setzen voraus, daß der Glucoseabbau von einer der maximalen Konzentration (s. S. 442) entsprechenden Bakterienzahl also etwa $5{,}0 \cdot 10^8$ pro Kubikzentimeter durchgeführt wird. Entsprechend den Angaben *K. von Angerers*[1]) über das Gewicht des einzelnen Vibrio cholerae ($3{,}3 \cdot 10^{-13}$ g) müßte die maximale Zahl der im Kubikzentimeter gleichzeitig lebenden Vibrionen $3{,}3 \cdot 10^{-13} \cdot 5{,}0 \cdot 10^8 = 0{,}165$ mg wiegen. In 100 ccm Kulturlösung wäre demnach eine maximale Masse lebender Bakterien von 16,5 mg anzunehmen. Legen wir diese Masse den in

[1]) Arch. f. Hyg. **88**, 145. 1919.

Tabelle I angeführten Umsätzen zugrunde, so ergibt sich, daß der Vibrio cholerae in einer Zeit von 1,5—2,5 Stunden eine seinem eigenen Gewicht entsprechende Menge Glucose aufzuspalten vermag.

II. Die Art und Menge der auf Glucose-Asparaginsäurelösungen durch den Vibrio cholerae erzeugten Säuren.

Versuch Nr.	In 100 ccm Kultur						Milchsäure aus 100 g Glucose g
	Umgesetzte Glucose g	Gesamtmenge flüchtige Säure ccm-n	Ameisensäure		Essigsäure		
			ccm-n	mg	ccm-n	mg	
18A	1,360	5,6	—	—	—	—	49,5
18B	1,344	4,6	—	—	—	—	45,6
19A	1,010	4,15	2,90	133	1,25	75	48,2
19B	0,973	4,00	3,00	138	1,00	60	47,5

Die bilanzmäßigen Beziehungen der *flüchtigen Säuren* zu dem umgesetzten Traubenzucker möchten wir vorerst nicht erörtern, da diesbezügliche Versuche — insbesondere über das Verhalten der Asparaginsäure auf glucosehaltigen Nährlösungen — noch nicht abgeschlossen sind; auch fehlen noch Ermittlungen über das Auftreten von CO_2.

Dagegen geht aus den Zahlen der letzten Kolumne hervor, daß der Abbau der Glucose sich zu etwa 50% auf dem Wege der „*Glykolyse*" vollzieht. Die allgemeine Bedeutung dieser Reaktion als *energiespendenden* Vorgangs ist durch die neueren Arbeiten von *O. Meyerhof* und *O. Warburg* hinlänglich erwiesen. Für den besonderen Fall des Choleraerregers sei der *anaerobe* Charakter des glykolytischen Prozesses ausdrücklich hervorgehoben. Es ist bemerkenswert und vielleicht für die Pathogenese der Cholera von Bedeutung, daß dieser — nach den Erfahrungen der bakteriologischen Praxis — obligat aerobe Erreger einen erheblichen Teil seines Energiebedarfes aus einem typisch anoxybiontischen Spaltungsvorgang zu decken vermag[1]). Nur so ist wohl auch die rapide Vermehrung des Vibrio cholerae in dem anaeroben Milieu des infizierten Darmes zu verstehen.

IV. Zusammenfassung.

Der Vibrio cholerae ist imstande, aus der l-Asparaginsäure als einziger N- und C-Quelle seinen gesamten Stoff- und Energiebedarf zu decken.

Der Abbau der l-Asparaginsäure durch den Choleraerreger stellt einen oxydativen Stoffwechselprozeß dar, der zu den Endprodukten Ammoniak, Essigsäure und Kohlensäure führt. Die Gesamtmenge der aufgefundenen Dissimilationsprodukte ist annähernd 100% der umgesetzten Aminosäure äquivalent.

Auf Glucose-Asparaginsäure-Nährlösung bilden die Choleravibrionen Äthylalkohol (in kleinen Mengen), Ameisensäure und Essigsäure sowie Milchsäure. Die anaerobe Glykolyse umfaßt 50% der gesamten Kohlehydratdissimilation.

[1]) Siehe die inzwischen (Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 24) erschienene Mitteilung „*Die anaerobe Züchtung des Vibrio cholerae*".

(Aus der Sanitätsanstalt des Schlachthofes München.)

Gibt es Fleischvergiftungen beim Menschen, die auf den Genuß intravital infizierten Schweinefleisches mit Bakterien der Paratyphus-Enteritidisgruppe zurückzuführen sind?

Von

Ob.-Vet.-Rat Prof. Dr. **Max Müller.**

Die zutreffende Beantwortung der obigen Frage ist sowohl für die *Human-* als auch die *Veterinärmedizin* von besonderer Bedeutung. Von maßgebenden Ärzten und Tierärzten wird immer wieder der Standpunkt vertreten, daß die Paratyphusbakterien des Schweines nicht pathogen für den Menschen seien und daß demzufolge die *intravitale* Infektion des Schweinefleisches mit Paratyphusbakterien für das Entstehen von sog. Fleischvergiftungen beim Menschen nicht in Frage komme. *v. Ostertag* vertritt die Anschauung, daß die Infektionen der Schweine mit Bakterien der Paratyphusgruppe nicht geeignet seien, Fleischvergiftungen beim Menschen zu erzeugen. Die Unschädlichkeit der Paratyphusbakterien des Schweines für den Menschen werde tagtäglich durch die Unschädlichkeit des Genusses solchen Fleisches für den Menschen als auch der Ungefährlichkeit des Hantierens der Metzger mit den veränderten Teilen der erkrankten Tiere dargetan.

Auf der 11. Versammlung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie hat auch *Uhlenhuth* seine Ansicht dahingehend geäußert, daß der Bacillus suipestifer als nicht pathogen für den Menschen anzusehen sei. Weiterhin hat *Uhlenhuth* in Verbindung mit *W. Seiffert* sich dahin geäußert, Tausende und abertausende schweinepestkranker Schweine seien zur Schlachtung gekommen, ohne daß der Genuß des Fleiches dieser Tiere zu einer Infektion des Menschen geführt habe, mit Ausnahme eines von *M. Müller* mitgeteilen Falles. In Anbetracht der nahezu täglich erhärteten Ungefährlichkeit des Pestiferbacillus könne man diesem einen Falle unmöglich eine ausschlaggebende Bedeutung beimessen. So zahlreich die durch Angehörige der Paratyphusgruppe hervorgerufenen *seuchenhaften* Erscheinungen unserer Haustiere auch seien, fände sich in der gesamten Literatur für alle Schlachttiere nur ein einziger Fall bezeichnet, der zum Ausgangspunkt einer menschlichen Epidemie wurde (Schafseuche in Überruhr). Alle übrigen paratyphösen

Seuchen unserer Schlachttiere scheinen für die humane Pathogenese belanglos zu sein. Nur *Einzelerkrankungen* der Schlachttiere sollen zu Fleischvergiftungen beim Menschen Veranlassung geben. Insoweit bei Einzelerkrankungen und Seuchen von Schweinen das Fleich dieser Schweine zu Erkrankungen des Menschen geführt hat, seien Zweifel berechtigt, weil die von *Pouchet*, *Tiberti*, *Demnitz* u. a. mitgeteilten Fälle nicht einwandfrei geklärt seien. Nach einer privaten Mitteilung *Uhlenhuths* soll in der Regel der Bacillus *suipestifer* nicht pathogen für den Menschen sein. Es kämen aber auch Paratyphus B-Bacillen und Gärtnerbacillen beim Schweine vor. Da *Uhlenhuth* Fleichvergiftungen durch intravital infiziertes Schweinefleich mit Paratyphus B- und Gärtnerbacillen nicht angegeben, und den Oberurseler Fall als Ausnahme erachtet hat, liegt jedenfalls bislang kein ausdrückliches Zugeständnis *Uhlenhuths* bezüglich der Pathogenität intravital mit Bakterien der Paratyphus-Enteritidisgruppe inficierten Schweinefleiches für den Menschen vor, abgesehen davon, daß meine Fragestellung nicht von der Typenfrage sondern von der für die Fleischbeschau sehr wichtigen Tatsache ausgeht, daß Schweinefleich, das als intravital mit irgendwelchen Bakterien der Paratyphusgruppe zu erachten ist, sich als infektiös und krankheitserzeugend für den Menschen erwiesen hat.

Deshalb will ich im folgenden zunächst vom Standpunkte der *Epidemiologie* aus und dann vom Standpunkte der *Kasuistik* aus zeigen, daß dem intravital infizierten Schweinefleisch bei Einzelerkrankungen und bei Seuchen der Schweine eine viel größere Bedeutung hinsichtlich des Entstehens tierischer Paratyphosen beim Menschen zukommt, als bisher, um mit Worten *Bollingers* zu sprechen, zum Schaden der menschlichen Gesundheit angenommen worden ist.

Nach *Hübener* war in 42 Fällen mit positivem Bacillenfund 15mal *Schweinefleisch* die Infektionsquelle. Aus der vorbakteriologischen Zeit gibt *Hübener* nach *Schneidemühl* an, daß unter 61 Fleischvergiftungen 3mal *Schweinefleisch* als Infektionsträger in Frage komme. *Gualducci* hat nach *Hübener* bis zum Jahre 1908 bei 88 Fällen von Fleischvergiftungen 18mal *Schweinefleisch* und *Sacquepée* in 36 Fällen von Fleischvergiftungen durch Bakterien der Paratyphus- und Gärtnergruppe 9mal *Schweinefleisch* als die Infektionsquelle angegeben. Nach einer weiteren Zusammenstellung *Hübeners* von 23 Epidemien mit positivem Bacillenbefund wurden 1mal im *Schweinefleisch* und 9mal in Wurst, Hackfleisch oder Fleischpastete ebenfalls Bakterien nachgewiesen.

Ballard hat nach *Durham* 1890/91 12 Fleischvergiftungen aufgezählt, von denen 10 auf den Genuß von *Schweinefleisch* in irgendwelcher Form zurückzuführen waren.

Bei 84 von *v. Ostertag* registrierten Fällen hatte 6mal *Schweinefleisch* bei Fleischvergiftungen eine Rolle gespielt.

Standfuß gibt an, daß bei 113 Fleischvergiftungen 10mal *Schweinefleisch* Veranlassung hierzu gegeben hat, wobei 5mal Bakterien der Paratyphus-Enteritisgruppe im Schweinefleisch ermittelt wurden.

Kuppelmayr hat in den bekannt gewordenen Fleischvergiftungen der Jahre 1913—1922 809 Erkrankungen und 9 Todesfälle nach Genuß von *Schweinefleisch* registriert, wobei die durch den Genuß von Würsten aus Fleischgemischen entstandenen Erkrankungen nicht eingerechnet sind. Auf Würste entfallen nach *Kuppelmayr* 818 Erkrankungen mit 7 Todesfällen. Ein Drittel aller aufgeführten Fälle war auf den Genuß des Fleisches *notgeschlachteter* Tiere zurückzuführen. Die Zahl der durch den Genuß *des Fleisches von notgeschlachteten Tieren* hervorgerufenen Erkrankungen berechnet *Kuppelmayr* auf 56% der aufgeführten Krankheitsfälle. Hiernach können von den oben angeführten 818 Erkrankungen durch Schweinefleischgenuß 458 Erkrankungen auf den Genuß von *notgeschlachtetem* Schweinefleisch zurückgeführt werden. Insgesamt kam 1913—1921 *26mal Schweinefleisch* für die Entstehung von Paratyphusinfektionen beim Menschen in Frage. Von den 825 Erkrankungen nach Wurstgenuß könnten ebenfalls 462 Erkrankungen auf den Genuß von Würsten aus Fleisch *notgeschlachteter* Tiere errechnet werden, wobei die Mehrzahl der Erkrankungen wohl auf den Genuß *intravital* infizierten Schweinefleisches zurückfallen dürfte.

Nach epidemiologischen Untersuchungen von *O. Lentz* über die Herkunft der Fleischvergiftungen nehmen unter den Tieren, deren Fleisch zu Fleischvergiftungen Veranlassung gegeben hat, in der Vorkriegszeit Rinder und *Schweine* die *ersten* Stellen ein. Hierbei ist es bei Schweinen die *Schweinepest und Schweineseuche*, die an der Erzeugung der Fleischvergiftungen in erster Linie teilnimmt.

Aus der epidemiologischen Statistik ist demnach zu erkennen, daß *Schweinefleisch an der Entstehung von Fleischvergiftungen ebenso wie das Fleisch anderer Schlachttierarten beteiligt ist.* Und ebenso hat sich auch hier wie für die übrigen Schlachttierfleischarten ergeben, daß der Genuß des Fleisches *notgeschlachteter Schweine* in erster Linie Infektionen des Menschen bewirkte.

Das Vorkommen von Paratyphusbakterien beim Schweine in den Organen und in dem Fleisch ist auf Grund der Untersuchungsergebnisse zahlreicher Autoren bekannt. Der Typus dieser Paratyphusbakterien kann vorerst außer Frage bleiben, wenn von der Voraussetzung ausgegangen wird, daß die bei wirklichen Fleischvergiftungen des Menschen gefundenen Typen von Paratyphusbakterien von intravital infiziertem Tierfleisch stammen müssen. Nach den eingehenden Untersuchungen von *Uhlenhuth, Zeller* u. a. lassen sich die bei Mensch und Tier gefundenen Typen nicht in nur als menschenpathogen oder nur als tierpathogen anzusprechende Typen scheiden.

Daß die bei Schweinen vorkommenden Paratyphusinfektionen meist unschädlich für den Menschen sind oder bleiben ist richtig. Dies gilt aber nicht allein für die Paratyphusbakterien des Schweines, sondern auch für die seltene Übertragung der Paratyphusbakterien der übrigen Schlachttiere (Rind, Kalb, Pferd, Schaf) u. a. Tiere (z. B. Mäuse, Ratten, Papageien) auf den Menschen. Nicht zutreffend aber ist die von *Glage*, *Conradi* und *Rommeler* vertretene Ansicht, daß das Fleisch der Haustiere intravital nicht mit auf den Menschen übertragbaren Paratyphusbakterien infiziert würde. Die intravitale Infektion des Fleisches notgschlachteter Tiere sei unbewiesen. Die Fälle in denen das Fleisch notgeschlachteter Tiere zu Fleischvergiftungen Veranlassung gegeben habe, seien daher als postmortaler Befall des Fleisches zu erachten, da die Paratyphusbakterien sich mit Vorliebe auf dem Fleische notgeschlachteter Tiere *postmortal* ansiedeln würden. Wäre dies richtig, so gäbe es sensu strictore überhaupt keine Paratyphusinfektionen des Menschen tierischen Ursprunges, sondern nur Nahrungsmittelinfektionen.

Auch die Angabe, die Paratyphusinfektionen der Schweine, bei denen der Bacillus suipestifer einen besonderen Virulenzgrad erreicht, sei in allen Kulturländern so stark verbreitet, daß Epidemien bei den Menschen, die die kranken Schweine warten, pflegen und schlachten an der Tagesordnung sein müßten, hiervon aber nichts bekannt sei, ist weder hinsichtlich des Vorkommens von Infektionen der Schweine mit Paratyphusbakterien in Fleisch und Organen richtig noch hinsichtlich des vermeintlichen Nichtinfiziertwerdens von Metzgern.

Zunächst läßt sich die behauptete Häufigkeit des Paratyphus der Schweine als Seuche unter dem Namen „bacilläre Schweinepest“ zahlenmäßig nicht belegen. Weder die Seuchenstatistik noch die Fleischbeschaustatistik gibt Zahlenmaterial für die vermeintliche Häufigkeit seuchenartig auftretender Paratyphusinfektionen von Schweinen mit gleichzeitiger Infektion des Fleisches und der Organe dieser Schweine. Nach den Jahresberichten des Veterinäruntersuchungsamtes zu Potsdam für die Jahre 1922/23 und 24 wurden hier in 210 verdächtigen Fällen bei Schweinen in nur 3 Fällen = 1,4% der paratyphusverdächtigen Fälle Bakterien aus der Paratyphus-Enteritidisgruppe festgestellt. Nach dem Gesamtergebnis der bakteriologischen Fleischbeschau für Preußen 1923 wurden bei 850 paratyphusverdächtigen Schweinen 17 mal = 2% Paratyphusbakterien ermittelt. *Manninger* hat in Ungarn in den ersten 6 Monaten des Jahres 1925 akuten Paratyphus bei Ferkeln in 12 Beständen und chronischen Paratyphus in 9 Beständen ermitteln können. Mithin kann von einer großen Häufigkeit von Paratyphusbakterien in Fleisch und Organen gewerblich geschlachteter und notgeschlachteter Schweine vorerst *keine* Rede sein, wenn auch einzelne

Autoren höhere Zahlen über das Vorkommen von Paratyphusbakterien im *Darmkote* gefunden haben (*Uhlenhuth* und *Hübener* 8,4%, *Grabert* u. a.).

Ausschlaggebend für die Übertragungsmöglichkeit suiler Paratyphusbakterien vom Schwein auf den Menschen sind eben nur die Befunde in *Fleisch* und *Organen*, weil diese der Mensch gekocht oder roh genießt. Im ersten Falle wird das schädigende Moment bei genügender Sterilisation beseitigt, diese Fälle treten also ebenfalls als unschädlich in Erscheinung. Aber auch Fälle der letzteren Art, in denen die Bakterien im *rohen* Schweinefleische und beim Menschen nachzuweisen waren, sind nicht häufig. Insbesondere sog. schlagend beweisende und offensichtlich erkennbare Fälle, in denen ein Zusammenhang der Erkrankungen des Menschen mit intravital infiziertem Fleisch nachzuweisen war, sind ja für alle Tierarten spärlich; so spärlich, daß eine Reihe von Autoren (*Glage*, *Conradi*, *Rommeler* u. a.) sogar dazu übergegangen ist, zu behaupten, die Übertragung tierischer Paratyphusbakterien auf den Menschen sei *überhaupt unbewiesen* — der Mensch erkranke *nicht* durch den Genuß intravital infizierten Fleisches von Tieren an Paratyphus. So hat *Conradi* sich über das mit Paratyphusbakterien infizierte Schweinefleisch folgendermaßen geäußert: „Für den Arzt, der mit der Feststellung der Ursache einer Fleischvergiftung beauftragt ist, liegt es gewiß sehr nahe, einen Zusammenhang zwischen den Erkrankungen der Menschen und der schweren Erkrankung der Schweine an Schweinepest anzunehmen, wenn das Fleisch solcher Tiere in Frage kommt. Die Schwere einer Haustiererkrankung ist aber noch lange kein Beweis für die Übertragungsmöglichkeit auf den Menschen. — *Glage* sagt, die Fleischvergifterforschung habe trotz ihres Alters noch keine anerkannte Beschreibung einer durch menschenpathogene Paratyphusbacillen veranlaßten Tierkrankheit geliefert. *Gärtner* sei nach seinem dürftigen Material und Untersuchungsverfahren nicht berechtigt gewesen, den Bacillus enteritidis bei der Frankenhausener Fleischvergiftung als Erreger der Darmentzündung des Rindes anzusprechen. Das Fleischbeschaugesetz sei ihm nicht gefolgt und erkläre Fleisch von Tieren mit Enteritis nicht für untauglich. — Auf diese Weise kann man schließlich wieder zu der früher schon einmal behaupteten generellen Unschädlichkeit allen Fleisches kranker Schlachttiere kommen, wenn man die Tatsachen, die die Natur uns vor Augen führt, von falschen Annahmen ausgehend, verkennt. Die Naturwissenschaft stützt sich doch in erster Linie auf das Erkennen der Zusammenhänge, die sich aus den Tatsachen ergeben. Haben wir diese Zusammenhänge richtig erkannt, so erachten wir eine neue auf gleicher Erkenntnis beruhende Tatsache als „erwiesen", als dem Naturgeschehen entsprechend. Wenn dem Einzelnen dieses oder jenes nicht klar genug erkennbar erscheint,

so bleibt das ohne Einfluß auf die Richtigkeit des Naturgeschehens als solchem. Die Natur läßt sich von uns nichts „beweisen"!

Der Zusammenhang tierischer Paratyphosen des Menschen mit Paratyphusinfektionen der Schlachttiere gelingt deshalb so schwer zu beweisen, weil in der Regel bei der Sicherung der Diagnose für den Menschen, sofern die Herkunft der Infektion auf Fleisch und Organe *notgeschlachteter* Tiere zurückweist, Fleisch und Organe der Tiere nicht mehr vorhanden zu sein pflegen. Hiermit wird das Vorliegen einer gleichartigen intravitalen Infektion beim Tiere in Frage gestellt und damit die lückenlose Beweiskette für die Übertragung der Infektionen vom Tier auf den Menschen unterbrochen.

Die Häufung solcher lückenhafter Erhebungen in Einzelfällen in Verbindung mit dem zweifelsohne selten vorkommenden Infiziertwerden der Schweinemetzger, bewirkt dann den ablehnenden Standpunkt maßgebender Persönlichkeiten in der Frage der Pathogenität der Paratyphusbakterien der Schweine für den Menschen. Das Festhalten an diesem Standpunkt wird dann gefördert durch das Bestreben, die beim Tier und Mensch gefundenen Paratyphusbakterien in Typen einzuteilen, die als nur tier- oder nur menschenpathogen anzusprechen sein sollen. Beobachtungen von Übertragungen intravitaler Infektionen von Fleisch und Organen des Schweines auf den Menschen durch Fleischgenuß lassen sich aber hiermit nicht in Einklang bringen. Dies will ich im folgenden mit einer Kasuistik hierher gehöriger Fälle so belegen, daß jene Fälle, die die Übertragbarkeit suiler Paratyphusbakterien auf den Menschen am leichtesten erkennen lassen, zunächst aufgeführt werden und dann solche Beobachtungen folgen, die ebenfalls für Infektionen des Menschen durch intravital infiziertes Schweinefleisch sprechen, wenn man keinen generell ablehnenden Standpunkt einnimmt.

Der am einwandfreiesten beobachtete Fall, der die Pathogenität suiler Paratyphusbacillen für den Menschen erkennen läßt, dürfte der Oberurseler Fall sein, den ich an anderer Stelle nach den mir von Dr. *Pohle* gemachten Angaben schon dargelegt habe. Im Hinblick darauf, daß diese von sachverständigster Seite aus in allen Entwicklungsphasen gemachten Beobachtungen mehrfach als nicht beweisend erachtet worden sind, lege ich den Sachverhalt des Falles nochmals dar.

Es handelt sich um einen Schweinebestand, von dem bekannt war, daß die Schweine nicht selten mit *Paratyphusbakterien vom Voldagsentypus* (Ferkeltyphus nach *Pfeiler*) infiziert waren. In diesem Schweinebestand wurden bei verendeten Ferkeln seit November 1916 von *Pohle* immer wieder die gleichen Paratyphusbakterien von Voldagsentypus[1]) gefunden.

[1]) In meinen ersten Angaben im Zentralblatt **81**; 1918 ist der Typus der Bakterien als Suipestifertypus (Para-B-Typus) erachtet worden. Es handelte sich aber, worauf Dr. *Pohle* nachträglich hinwies, um Infektionen durch den Voldagsentypus.

Es konnte auch hier die von *Uhlenhuth* und seinen Mitarbeitern zuerst gemachte Beobachtung bestätigt werden, daß die Virusseuche der Schweine häufig vergesellschaftet mit Paratyphusinfektionen ist. Daß die durch das filtrierbare Virus erzeugte Seuche alimentär nicht auf den Menschen übertragbar ist, hat die Erfahrung gelehrt; nicht aber, daß auch die Paratyphusinfektionen der Schweine unschädlich für den Menschen sind.

In dem hier in Frage stehenden Schweinebestande erkrankten im Februar 1917 7 Schweine in seuchenverdächtiger Weise, die demzufolge *notgeschlachtet* wurden. Einige Tiere waren bereits kurz zuvor verendet, wie auch weitere Tiere späterhin noch erkrankten, verendeten und notgeschlachtet wurden. Das Fleisch der Tiere wurde von dem zuständigen Tierarzt bestimmungsgemäß als bedingt tauglich infolge der Erscheinungen akuter Virusseuche erklärt. Die sämtlichen Darmgekröse, die Lungen und die nicht vollkommen normal erscheinenden Milzen wurden als untauglich beschlagnahmt und vernichtet.

Das Fleisch eines dieser Schweine, welches fleischbeschaulich wahrnehmbare Veränderungen weder an dem Fleische noch den Organen zeigte, wurde im Gehöft selbst zur Wurstbereitung verwertet. Es wurde gekocht, dann zerkleinert und gehackt. Dem zur Wurstbereitung zerkleinerten Fleische wurden die *roh gehackten, nicht veränderten Lebern aller 7 notgeschlachteten Schweine beigemischt.* Von dieser Wurstmasse haben, bevor dieselben in Därme abgefüllt und erneut gekocht worden ist, 5 Personen gekostet. 2 Personen, die den Wurstteig nur mit annähernd 2 Messerspitzen voll gekostet haben, spürten keine Beschwerden. Dagegen erkrankten die beiden Metzgerburschen, die den Wurstbrei reichlicher gekostet hatten, und ein Kind an heftigem Durchfall, Fieber, Kopfweh und Erbrechen. Nach 3—6tägiger Krankheitsdauer waren die Beschwerden wieder behoben. Alle Personen, welche den in Därme abgefüllten und erneut gebrühten Wurstteig verzehrt haben, sind gesund geblieben. — Ein Teil der Wurstmasse mit den roh zugefügten Lebern konnte wegen Mangel an Därmen nicht mehr abgefüllt werden. Diese Wurstmasse blieb über Nacht liegen und wurde am folgenden Tage an eine Anzahl Personen abgegeben. Über Nacht hatte der Wurstbrei die durch den Leberzusatz anfänglich etwas rötliche Färbung verloren und sah vollkommen grau wie das gehackt und gekocht gewesene Fleisch aus. Die Abnehmer waren demzufolge in dem Glauben, der Brei bestehe nur aus gekochtem Fleisch und verwendeten den Wurstbrei daher zum Bestreichen des Brotes. In dieser Weise ist die Wurstmasse von 15 Personen verzehrt worden, die alle erkrankten. Die Krankheitserscheinungen bestanden in Fieber von 38—39°, Erbrechen, Schüttelfrösten, Ohnmachtsanfällen, Leibschmerzen, Schmerzen in den Beinen und starkem Durchfall. Die Krankheitsdauer betrug durch-

schnittlich 6—10 Tage. Bei einigen Personen traten nach weiteren 8 Tagen weniger heftige Rückfälle ein. Todesfälle blieben glücklicherweise aus.

Nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome bei den Konsumenten wurde ein Rest des schädlich wirkenden Wurstbreies von Dr. *Pohle* bakteriologisch untersucht und in demselben *zahlreiche Paratyphusbakterien vom Voldagsentypus nachgewiesen.* Das Blutserum einer der erkrankt gewesenen Personen wurde nach 4 Monaten hinsichtlich seiner Typenaffinität geprüft und bekundete diese einwandfrei für Voldagsenkulturen bis zu Verdünnungen von 1 : 400, für einen Suispestiferstamm bis 1 : 200, für einen Para-B-, Para-A- und Gärtnerstamm, jedoch keine Affinität, selbst bei 1 : 20 nicht. —

Die *intravitale Infektion* der notgeschlachteten Schweine ergibt sich fernerhin aus folgendem: In dem Bestande, dem die notgeschlachteten Schweine entstammten, verendeten teils einige Tage vorher, teils einige Tage nachher weitere 11 Schweine, die sich sämtlich stark mit dem Bacillus Voldagsen infiziert erwiesen. Weitere Infektionen der Menschen nach dem Genuß des, wie es scheint, nur gekocht und gebraten genossenen Schweinefleisches wurden nicht beobachtet bzw. festgestellt.

Der vorstehende Fall hat für die Beantwortung der Pathogenität der Schweineparatyphusbacillen für den Menschen deshalb eine hervorragende Bedeutung, weil er einem unfreiwilligerweise am Menschen vorgenommenen Experimente gleichkommt. — Er zeigt zunächst, wie der Genuß intravital infizierten Schweinefleisches, sofern das Fleisch genügend erhitzt wird, *nicht* als schädigend für den Menschen in Erscheinung tritt, im Gegensatz zu Würsten, Sülzen und anderen Herstellungsarten zerkleinerten Schweinefleisches, die vielfach im Innern nicht bis zu dem Grade erhitzt werden, daß die vorhandenen Paratyphusbakterien abgetötet werden. Hierauf weist ja auch die epidemiologische Erfahrung und Statistik hin, die durchaus nicht für alle Fälle, in denen der Zusammenhang mit intravital erfolgter Infektion des Schlachttierfleisches nicht erkenntlich geworden ist, die Annahme einer postmortalen Infektion des Fleisches ohne weiteres zuläßt, weil eben der sichere Nachweis für die gegeben gewesene intravitale Infektion des Fleisches in der Regel aus schon erörterten Gründen nicht zu erbringen ist. — Auch im vorliegenden Falle wäre das Pathogenitätsvermögen der Voldagsenbakterien, den Menschen zu infizieren, völlig unbemerkt geblieben, wenn nicht die Lebern, teils infolge der Not der Zeit, teils wegen ihrer besonderen Eignung zur Wurstbereitung verwendet worden wären und der *Leberbrei nicht roh* genossen worden wäre. Hier zeigte es sich offenkundig, daß auch die Schweinemetzger erkranken, wenn sie virulente tierische Paratyphusbakterien des Fleisches alimentär aufnehmen, ebenso wie auch die übrigen Personen erkrankten, die den

Wurstbrei roh verzehrten. Das vermeintliche Nichterkranken der Metzger an Paratyphus suilen Ursprunges läßt sich daher nicht mehr als Scheinbeweis gegen die vermeintliche Unschädlichkeit der Paratyphusbakterien des Schweines für den Menschen verwerten. Auch in einem weiter unten von *Karsten* und *Ehrlich* mitgeteilten Fall erkrankten die Metzger an suilem Paratyphus, abgesehen davon, daß der Mensch, wie er im Schweinemetzger gegeben ist, sich doch in keiner Weise von den übrigen Menschen unterscheidet, die an suilem Paratyphus erkrankt sind. Daß diese einwandfreien Beobachtungen nicht in die Lehre von der Unschädlichkeit der Paratyphusbakterien des Schweines für den Menschen passen, gebe ich gerne zu. Diesen einwandfreien Beobachtungen aber deshalb die Beweiskraft versagen zu wollen, weil sich der ganze Vorgang unter fachwissenschaftlicher Vor- und Nachkontrolle abgespielt hat, ist schwer verständlich; denn die fachwissenschaftliche Beobachtung allein ist doch gerade dazu berufen, die Wechselbeziehungen von Infektionen des Menschen zu gleichartigen Infektionen der Schlachttiere klarzulegen, insbesondere wenn Wechselbeziehungen zutage treten, die die epidemiologische Kasuistik und Statistik immer wieder von neuem erkennen läßt. Wir brauchen uns doch das Erkennen offenkundig gegebener Tatsachen durch einen unfruchtbaren Negativismus nicht so zu erschweren, daß ein alles verwirrender Widerspruch zutage tritt! Denn wenn wir aus offenkundig zutage tretenden Beobachtungen nicht auch die entsprechenden Folgerungen ziehen, kann auch der wirksamen Bekämpfung des Paratyphus des Menschen nicht der Weg geebnet werden. — Wie meine Darlegungen zeigen werden, sind Paratyphuserkrankungen des Menschen okkulter Herkunft wesentlich häufiger auf Infektionen tierischer Herkunft zurückzuführen, als dies bisher auf der verhängnisvollen Lehre von der Unschädlichkeit der tierischen Paratyphusbakterien für den Menschen angenommen worden ist.

Zudem sind Infektionen mit Bakterien vom Voldagsentypus gar nicht allzu selten beim Menschen beobachtet worden. Ich verweise auf die ersten Beobachtungen von *Bernhardt* der 4 Infektionen mit tödlichem Ausgang mitgeteilt hat, die er auf Fleischvergiftung zurückführt. Hinsichtlich der Annahme *Bernhardts*, daß die Epidemie im Kreise Elbing mit 35 Erkrankungen und 1 Todesfall mit dem Genuß des Fleisches einer notgeschlachteten Kuh zusammenhänge hat *Ilgner*, vom veterinären Standpunkte an der Frage der Herkunft der Infektion interessiert, darauf hingewiesen, daß auch hier *Schweinefleisch mitgenossen wurde.* Dieses Schwein stammte aus einer Käserei, die ihren Schweinebestand wegen *Schweinepest* hatte abschlachten lassen. Wie *Ilgner* bemerkt, erkrankten auch hier die Frauen am schwersten, die die aus Schweine- und Rindfleisch bestehende Hackfleischmischung

beim Zubereiten *roh* gekostet hatten. *Ilgner* gibt im Anschluß an diesen Fall der Vermutung Ausdruck, daß Schweinefleisch wohl häufiger die Ursache von Fleischvergiftungen bildet, als man allgemein annimmt.

W. Geißler hat zahlreiche Paratyphusfälle bei Menschen beobachtet, die er auf den Genuß von Schweinefleisch zurückführt. Im Stuhl fand *Geißler* Voldagsenstämme, die von A- und B-Serum nicht agglutiniert wurden, dagegen von einem gegen den Bacillus suipestifer seu Voldagsen gerichteten Immunserum bis zur Titergrenze von 1 : 3000. Die Herkunft dieser Infektionen beim Menschen in Pommern ist *Geißler* geneigt mit dem ausgebreiteten Auftreten der Schweinepest in Pommern in Verbindung zu bringen, jedoch hat *Geißler* den Zusammenhang durch den Genuß von infiziertem Schweinefleisch nicht näher erbracht. — Den Zusammenhang mit dem Auftreten von Schweinepest läßt aber die Fleischvergiftung in Hildesheim einwandfrei erkennen:

Nach den Angaben *Heimanns* erkrankten in der Zeit von 22. bis 26. April 1911 in Hildesheim 91 Personen an Fleischvergiftung nach dem Genuß von *Schweinefleisch.* In 7 Fleischproben und 11 Stuhlproben, die von den nach Genuß des Schweinefleisches erkrankten Personen stammten, wurden konstant die gleichen Bakterien ermittelt, die nach ihrem morphologischen und kulturellen Eigenschaften wie auch hinsichtlich der Tierpathogenität zur Paratyphusgruppe gehörten. Sie wurden von *Heimann* wegen ihres agglutinatorischen Verhaltens als Paratyphus-C-Bacillen angesprochen, dürften aber als zur Voldagsengruppe gehörig zu erachten sein. Des weiteren wurde folgendes festgestellt: die 91 erkrankten Personen hatten ausnahmslos Hackfleisch in *rohem oder leicht angebratenem* Zustande genossen. Die ersten Krankheitserscheinungen traten bei Kindern unter 10 Jahren 1—4 Stunden, bei älteren Personen etwas später, spätestens aber nach Ablauf von 24 Stunden nach dem Genuß des Fleisches auf. 86 Erkrankte hatten ihr Fleisch vom Metzger S. die übrigen vom Metzger L. bezogen. Beide Metzger hatten wieder *notgeschlachtete Schweine* gekauft, und zwar S. 5 Stück und L. 2 Stück. Die Schweine stammten aus einem großen Bestande von 303 Schweinen und waren wegen mangelnder Freßlust am 13. und 14. April geschlachtet worden. Bei der durch einen Tierarzt vorgenommenen Beschau waren die Schweine als volltauglich zum Genuß befunden worden. Die ausgeschlachteten Schweine wurden in einem sauberen Kellerraum neben dem Eisraum bis zum 18. April hängend aufbewahrt und dann an die beiden Metzger in Hildesheim verkauft. Hier traten vom 22. bis 26. April die Erkrankungen beim Menschen in Erscheinung. Die übrigen Schweine wurden am 18. und 19. April abgeschlachtet, weil weitere Tiere einen kranken Eindruck machten. Sie drängten sich meist zusammen, lagen am Boden und husteten. Bei den Schweinen wurde das Vorliegen von *Schweineseuche*

festgestellt. Teils waren die Lungenspitzen erkrankt und mit dem Rippenfell verwachsen, teils waren *größere Teile der Lunge erkrankt.* An den Organen des Bauches und an den Därmen wurden *keine* krankhaften Veränderungen festgestellt. 5 Schweine wurden wegen Gelbsucht und eitriger Rippenfellentzündung als untauglich begutachtet. Von den übrigen 287 Schweinen wurden die *Eingeweide vernichtet* und die Tierkörper freigegeben. Sie wurden nach Hannover und Düsseldorf verkauft. Erkrankungen nach dem Genuß des Fleisches dieser Tiere sind nicht bekannt geworden.

Daß das Fleisch der 5 in Hildesheim verkauften und konsumierten Schweine die Infektionserreger enthielt, wurde bakteriologisch festgestellt. Es wurden die Paratyphusbacillen nur in solchem Fleische gefunden, das entweder nur aus Schweinefleisch oder aus Schweine- und Rindfleisch bestand, nicht aber im Rindfleisch allein, und zwar sowohl im Schweinefleisch des Metzgers S. als auch im Schweinefleisch des Metzgers L.

Die Hildesheimer Epidemie läßt somit die Übertragbarkeit suiler Paratyphusinfektionen auf den Menschen klar erkennen und ergänzt sich mit den Oberurseler Beobachtungen zu einem völlig klaren Bilde. Bei den 303 Schweinen lag der ganzen Sachlage entsprechend die *Virusseuche* der Schweine vor, die mit einer latenten *Paratyphusinfektion* kompliziert war. Das Vorkommen dieser Mischinfektionen von Paratyphus und Virusseuche bei Schweinen ist ja bekannt und im vorliegenden Hildesheimer Fall insofern von Bedeutung, als der Einwand einer postmortalen Infektion des Fleisches hinfällig wird. Inwieweit diese Paratyphusinfektion den Bestand als solchen ergriffen hatte, ist unbekannt geblieben. Da die Organe aller Schweine vernichtet wurden, sind weitere Infektionen insbesondere durch Wurstbereitung verhütet worden. Daß das Fleisch paratyphusinfizierter Schweine meist unschädlich für den Menschen zu sein pflegt, insbesondere wenn es alsbald nach der Schlachtung gekocht oder gut durchgebraten wird, ist ebenfalls sowohl für die Schweine, wie auch andere Schlachttiere bekannt. Auf diese Weise erklärt sich daher die Unschädlichkeit der nach Hannover und Düsseldorf verkauften Schweine sowie 5 weiterer Schweine, die mit den nach Hildesheim gekommenen Schweinen geschlachtet worden waren. Ob von den 7 nach Hildesheim gekommenen Schweinen alle infiziert waren, kann ebenfalls als fraglich gelten; jedenfalls aber waren mehrere Schweine nach dem Ergebnis der Untersuchung mit einem Hog-choleratyp infiziert, der sich als pathogen für 91 Personen erwies. — Die besondere Pathogenität dieses Schweinefleisches war durch eine Reihe von Umständen begünstigt worden. Das Fleisch der Schweine blieb 4—5 Tage in einem feuchten, wenn auch kühlen Kellerraum hängen und wurde dann noch 3—6 Tage beim Metzger und in den Haushaltungen

aufbewahrt. Zudem herrschten 1911 ab 16. April, wie *Heimanns* angibt, hohe sommerliche Temperaturen zwischen 20 und 26 Grad Celsius bei hohem Feuchtigkeitsgehalte der Luft, was die Keimvermehrung im Fleisch zweifelsohne ebenfalls begünstigte. Ein Teil des Fleisches war zwar gehackt worden, die Bakterien waren aber auch in der Tiefe des Schlegelfleisches und anderen nicht zerkleinerten Fleisches nachgewiesen worden. Eine Kontaktinfektion des Fleisches lag somit nicht vor. Für die intravital in das Fleisch eingedrungenen Bakterien waren vielmehr alle Bedingungen zu einer exzessiven Vermehrung post mortem gegeben, so daß sich das Fleisch jener infizierten Schweine, das längere Zeit aufbewahrt und außerdem noch zu Hackfleisch verarbeitet wurde als besonders infektiös für den Menschen erweisen mußte. — Wie aber auch die weiteren Angaben zeigen werden, sind es vielfach immer wieder *notgeschlachtete, krank gewesene Schweine*, die als mit Schweinepest oder Hautrötung behaftet angegeben werden, deren Fleisch sich als pathogen für den Menschen erweist und deren Fleisch selbst bei stärkster Infektion mit Paratyphusbakterien keine makroskopisch erkennbare Veränderungen insbesondere auch nicht die Veränderungen der sog. anatomischen Blutvergiftung zeigt. Hierauf habe ich seit Jahren ja ebenfalls immer wieder hingewiesen, um der falschen Vorstellung entgegenzutreten, als könne der Tierarzt anatomisch bei der Beschau das Vorliegen von Infektionen mit Paratyphusbakterien überhaupt irgendwie zuverlässig erkennen. *Selbst das Fleisch von Schweinen, die gewerblich geschlachtet und bei der Beschau als gesund zu erachten waren, hat sich als mit auf den Menschen übertragbaren Paratyphusbakterien infiziert erwiesen;* — eine Tatsache, die der restlosen Verhinderung der Übertragung fleischparasitärer Paratyphusinfektionen der Schlachttiere auf den Menschen erhebliche Schwierigkeiten bereiten wird. Ich werde hierauf weiter unten nochmals zurückkommen. —

In Stuhm (s. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene 34. Jahrg. 1924, S. 246 u. 291) wurde der Schweinebestand einer Molkerei wegen *Virusseuche* abgeschlachtet. Das Fleisch zweier Schweine wurde wegen akuter Seuche bestimmungsgemäß als bedingt tauglich erklärt und 3 Wochen lang gepöckelt. Beim Genuß erwies sich dieses Fleisch als schädlich für den Menschen. Im Fleische, insbesondere im Schinken wurden Paratyphusbakterien in Reinkultur nachgewiesen, die als Paratyphus-C-Bakterien erklärt wurden, weil sie sich serologisch nicht mit dem Bacillus suipestifer bzw. Paratyphus B identisch erwiesen. Vermutlich dürfte auch hier eine Infektion mit dem Voldagsentypus gegeben gewesen sein.

Nach einer persönlichen Mitteilung des Veterinärrates *Hartnack* erkrankten 1923 in Haynrode Mitglieder von etwa 12 Familien an *Paratyphus* nach dem Genuß des Fleisches eines wegen Darmkrankheit

notgeschlachteten Schweines. Ein zweites in gleicher Weise krank gewesenes Schwein gesundete wieder. Nach der Überzeugung *Hartnacks* handelte es sich auch hier um eine Paratyphuserkrankung des Schweines, die durch Fleischgenuß auf den Menschen übertragen wurde und hier bakteriologisch als Paratyphus diagnostiziert wurde.

Über ähnliche Erfahrungen dürften zahlreiche Tierärzte verfügen, die aber mit Mitteilungen über ihre Beobachtungen wegen der Verantwortungsfrage zurückhalten.

Aus meiner Erfahrung in der Sanitätsanstalt des Schlachthofes München kann ich über folgenden Fall berichten:

Im Juli 1914 erkrankten in München eine Reihe von Personen an *Paratyphus* nach dem Genuß von gepökeltem und geräuchertem Schweinefleische, das aus der Freibank bezogen worden war. Dieses Fleisch stammte von Schweinen, die bei der Fleischbeschau wegen *Virusseuche* beanstandet und als bedingt tauglich durch Pökeln und Räuchern begutachtet worden waren. Zu einer Untersuchung des beschuldigten Fleisches auf das Vorhandensein von Paratyphusbakterien war mir keine Gelegenheit mehr gegeben, da das Fleisch restlos verzehrt worden war. Im Hinblick auf die vorkommende Vergesellschaftung der Virusseuche mit Paratyphusinfektionen beim Schweine habe ich aber keinen Grund, die ärztlicherseits gemachte Annahme abzulehnen, daß auch hier die Ursache der Erkrankung der Menschen auf den Fleischgenuß zurückzuführen war. Die Ursache dieser Erkrankungen muß auch hier in einer *intravitalen Vergesellschaftung von Paratyphus mit Virusseuche bei Schweinen gesucht werden.* —

In der Tab. III der Abhandlung von *O. Lentz* wird im Jahre 1911 eine Hackfleischvergiftung mit 85 Erkrankungen durch Enteritisbakterien angegeben. In dem Bestande des Schweinezüchters herrschte *Schweinepest.* 1924 wurden 11 Erkrankungen an Paratyphus-B registriert infolge des Genusses von Fleisch, das von einem wegen *Schweineseuche notgeschlachteten Schweine* stammte. Fernerhin 8 weitere Erkrankungen mit 1 Todesfall an Paratyphus-B-infektionen, die verursacht waren durch den Genuß von Fleisch eines Tieres, das wegen *Schweinepest notgeschlachtet wurde.* — Die Lentzsche Tabelle läßt noch eine weitere Zahl von Erkrankungsfällen des Menschen nach Genuß von Schweinefleisch erkennen, die aber keine besonderen Anhaltspunkte für eine Scheidung in intravitale und postmortale Infektionen des Schweinefleisches bieten und demzufolge hier nicht weiter mit berücksichtigt werden können. Daß *Lentz* selbst in dem Genuß intravital infizierten Schweinefleisches nicht zu unterschätzende Gefahren für die Gesundheit des Menschen erblickt, habe ich eingangs erwähnt.

Fromme hat eine Fleischvergiftung beschrieben, die nach dem Genuß des Fleisches eines Schweines auftrat, das *gewerblich* in einem Schlacht-

hof geschlachtet und wegen sog. *chronischer Schweineseuche* freigegeben worden war. Das Schwein hatte einen Absceß an der Backe und wie sich bei der Zerlegung durch den Metzger herausstellte auch einen Absceß in der Tiefe des Schlegels. Infolge des Genusses von Fleisch dieses Schweines erkrankten 32 Personen, die das Fleisch roh mit Rindfleisch gemischt als Gehacktes gegessen hatten. Die Krankheitserscheinungen traten meist nach 12—18 Stunden auf, in einem Falle bereits nach Ablauf einer Stunde. Im Schlegelfleisch des Schweines und den Ausscheidungen von Kranken wurden Paratyphusbakterien vom Typus B. nachgewiesen. Auch die Seren von erkrankt Gewesenen agglutinierten nach 9—11 Tagen Para-B-Bacillen bis zu Verdünnungen 1 : 500.

Einen ähnlichen Fall hat *König* beobachtet. 24 Personen erkrankten innerhalb 24 Stunden nach Genuß *rohen Schinkens an Paratyphus*. Der Schinken enthielt in der Tiefe der Muskulatur Paratyphusbakterien. Ein Wirt hatte den Schinken zum *halben* Preise erstanden. *König* bemerkt daher mit Recht, daß der Schinken von einem *krank gewesenen, notgeschlachteten, paratyphusinfizierten Schweine* herstamme.

Potevin züchtet 1904 aus den Resten eines Schinkens, dessen Genuß bei einer Reihe von Personen Fleischvergiftung erzeugt hatte, einen Bacillus mit den Eigenschaften des Bacillus suipestifer. Dieser Bacillus erwies sich in Infektionsversuchen als pathogen für Schweine. *Pottevin* machte zu seinen Befunden folgende Bemerkungen: „Wenn der gleiche Ansteckungsstoff die Pneumo-Enteritis der Schweine, die Gastro-Enteritis und die paratyphöse Infektion des Menschen erzeugen kann, so wird es nicht mehr genügen, das Fleisch der Schlachthöfe zu überwachen. Da der Ansteckungsstoff in großen Mengen in den Faeces der kranken Tiere vorhanden ist, so muß man damit rechnen, daß er sich über das Gehöft ausbreitet und von hier mit der Milch und dem Wasser noch weiter verschleppt wird. Wir haben es deshalb hier mit einem neuen hygienischen Problem zu tun, dem Tierärzte und Ärzte gemeinsam ihre Aufmerksamkeit schenken müssen.“

Savage und *Gunson* sahen nach Genuß von Schweinefleisch 18 Personen erkranken, von denen 3 starben. Als Ursache der Krankheit wurden Paratyphusbacillen festgestellt, die nach der gegebenen Sachlage in dem genossenen Schweinefleisch enthalten waren. Ein Teil des Fleisches stammte von einem *Schweine*, das eines *Beinleidens* zufolge geschlachtet wurde.

Silberschmidt beobachtete 1896 die Erkrankung von 7 Personen in Form der Fleischvergiftung. Ein miterkranktes Kind starb. Das krankmachende Fleisch stammte von *Ferkeln*, die an einer mit *Hautrötung und Magendarmkatarrh* einhergehenden infektiösen Krankheit gelitten hatten und deren Fleisch bei der Beschau als bedingt tauglich erklärt

worden war. Demzufolge wurde das Fleisch gesalzen und geräuchert und nach Ablauf von 6 Wochen *ungekocht* verzehrt. Aus dem Fleische, Schinken und Rippenstücken, das bei der Untersuchung keine Abweichung in Aussehen, Farbe und Geruch zeigte, konnte ein zur Paratyphusgruppe gehöriger Bacillus gezüchtet werden.

Anschließend an diesen Fall berichtet *Zschokke*, daß nach Genuß rohen geräucherten Schinkens 9 Personen einer Familie erkrankten. Der Schinken stammte von einem *Schweine*, das nach Aussage des Laienbeschauers eine „*angefaulte*" Lunge gehabt hatte und *lahm* gegangen war. Die Krankheitserscheinungen bestanden in Gastroenteritis mit Erbrechen, Mattigkeit und hohem Fieber und traten 10 bis 36 Stunden nach Aufnahme des Fleisches ein. Die Krankheitsdauer betrug bei 7 Personen 6—8 Tage, bei einer Frau und einem Kinde mehrere Wochen. Auch der Hund, der die Schwartenstücke bekommen hatte, erkrankte an Magenkatarrh.

Wir sehen also immer, *wie die Infektiosität von intravital infiziertem Schweinefleisch durch das Aufbewahren in Salzlacke und Räuchern nicht nur nicht gehemmt sondern noch gesteigert wird.* — Eine ähnliche Beobachtung machten auch *Boers* und *Offerhaus.* 30 Personen erkrankten nach Genuß von Rauchfleisch. Im Rauchfleisch und in den Dejekten der Erkrankten wurden Bacillen vom Typus *Gärtner* nachgewiesen.

In 3 Ortschaften der Provinz Posen erkrankten Pfingsten 1896 eine große Anzahl von Personen, welche 26—27 Familien angehörten infolge des Genusses von *Schweinefleisch, Wurst und Blut.* In den Organen einer gestorbenen Person fand *Günther Paratyphusbakterien vom Hogcholeratypus.*

Ebenso erkrankten 1908 bei der Fleischvergiftung von Sirault über 100 Personen infolge des Genusses von *Schweinefleisch, Speck* und *Wurst.* 3 Personen starben. Bei den Erkrankten bzw. Gestorbenen sowie im Schweinehackfleisch und Würsten wurden von *Herman Paratyphusbakterien vom Hog-choleratypus* gefunden. Auch in Brügge wurde 1899 bei einer nach Genuß von *Schweinefleisch* aufgetretenen Massenerkrankung der Bacillus enteritidis *Gärtner* gefunden.

In Chadderton erkrankten nach Genuß von *Schweinefleisch* 54 Personen, von denen 4 starben. Die Seren von 29 Erkrankten agglutinierten die Fleischvergiftungserreger vom Hog-choleratypus, welche von *Günther* und *Durham* gefunden worden waren, in Verdünnungen von 1:100—1:1000 (zitiert nach *van Ermengem*).

G. Pouchet beobachtete nach Genuß von *Schweinefleisch* 48 Erkrankungen und 1 Todesfall. Er glaubt, daß das Fleisch von einem Schweine mit Pneumoenteritis stammte.

Prigge und *Sachs-Mücke* sahen 16 Personen, die an einer Tauffeierlichkeit teilnahmen, nach Genuß von *Schweinebraten an Paratyphus* erkranken.

F. Bardachzi und *Z. Barabas* beobachteten während des Krieges im Garnisonsspital zu Przemysl 4 Massenerkrankungen nach dem Genuß von *Schweinefleisch*, die nur bei Personen auftraten, welche Schweinefleisch genossen hatten. In 2 der Massenfälle konnten *Para-B-Bacillen* nachgewiesen werden. Eine Erkrankung des Küchenpersonals lag nicht vor, weshalb die Infektionsquelle in *Schweinefleisch* zu suchen war, das von Tieren mit *latenten* Paratyphusinfektionen stammte. In den Beständen, aus denen die Schweine für das Lazarett bezogen wurden, waren auch Erkrankungen an *Schweinepest* beobachtet worden.

Auch *Rimpau* hat durch folgenden Fall einwandfrei zeigen können, daß der Genuß von Fleisch paratyphusinfizierter Schweine Paratyphuserkrankungen beim Menschen hervorrufen kann.

In einer Ortschaft des Bezirksamtes Mindelheim war durch einen Schweinetransport aus Norddeutschland *Schweinepest* eingeschleppt worden. Im Haushalt K. wurde ein *krankes Schwein notgeschlachtet*, aber nicht der Beschau unterstellt. Nach dem Gutachten des Bezirkstierarztes war das Schwein an Schweineseuche oder Schweinepest erkrankt. Das Fleisch lag 8 Tage in der Sur und wurde dann einen Tag geräuchert. Der Vater und 6 Kinder aßen das Fleisch roh, die Mutter gekocht. Die Mutter erkrankte nicht, wohl aber der Vater und die 6 Kinder. In dem Fleische wurden, insbesondere in der Tiefe, massenhaft Paratyphus-B-Bacillen nachgewiesen. Die gleichen Bakterien waren sehr reichlich auch im Stuhl der Patienten.

Sehr lehrreich, hinsichtlich des Auftretens *latenter* Paratyphusinfektionen beim Schweine, ist auch folgender von *Riemer* berichtete Fall über eine Fleischvergiftung in Rostock. Hier erkrankten im Dezember 1907 63 Personen an Paratyphusinfektionen durch den Typus *Gärtner* nach Genuß von *Leberwurst*. Die Bakterien fanden sich zahlreich in der Wurst wie auch in den Ausscheidungen der Kranken. Die zur Wurst verwendeten Lebern stammten von den *Schweinen* eines Gutes, die nach den Aussagen des Fleischbeschauers bei der Beschau als *gesund* befunden wurden bis auf eines, dessen *Lunge erkrankt* war. Von dem Gutspersonal erkrankten ebenfalls 10 Personen nach dem Genuß der Wurst, und zwar erwies sich die Wurst anfänglich nur wenig als schädlich, wohingegen späterhin 1—2 Scheiben Wurst genügten, um schwere Krankheitserscheinungen auszulösen. Dieser ätiologisch ziemlich klare Fall steht in einer gewissen Parallele mit dem Oberurseler Fall einerseits, andererseits auch mit dem später noch zu besprechenden Middelburger Fall.

Tiberti sah 2—12 Stunden nach dem Genuß *gebrühter Schweinefleischwürste* ca. 30 Personen in Bologna an Paratyphus erkranken. 1 Person, die den Wurstbrei *roh* genossen hatte, *starb*. Bei den Erkrankten wurden Bakterien von *Suipestifertypus* gefunden. Die Blutseren von

5 Personen wiesen nach *Rocchi* einen Agglutiningehalt auf diesen Typus auf. Da in der Umgebung Bolognas die *Pneumoenteritis der Schweine* stark herrschte, sprachen *Tiberti* und *Rocchi* die Vermutung aus, daß es sich hier um Infektionen mit dem Salmon-Smithschen Hog-cholera-Bacillus handelte, die von ebenso infizierten Schweinen stammten. Auch *Gardenghi* sah nach Genuß von *Schweinefleisch* Infektionen mit vorherrschenden Darmerscheinungen, die durch den *Bacillus suipestifer*, den er sowohl bei den erkrankten Personen wie auch im Darme kranker, rekonvaleszenter, geheilter und gesunder Schweine fand, verursacht wurden.

Zu welchen Folgen *latente* Paratyphusinfektionen der Schweine führen können, zeigt eine von *Friedrichs* und *Gardiewsky* beobachtete Massenerkrankung verschiedener Truppenteile in Metz im Jahre 1909. Hier erkrankten 247 Mann an Paratyphus nach dem Genuß von *Schweinefleisch* und *Schwartenmagen*. In den Stühlen der Erkrankten und in einer Restprobe des Schwartenmagens wurden Paratyphusbakterien vom Typus *Gärtner* gefunden. Da nur in der Garnisonschlächterei geschlachtete und beschaute Schweine in Frage kamen, die zur Beanstandung *keine* Veranlassung gegeben haben, muß auch die Massenerkrankung auf eine *latente* Paratyphusinfektion eines oder mehrerer Schweine zurückgeführt werden.

Heller sah 1906 36 Personen an Paratyphus erkranken von denen 4 starben. Die Erkrankungen traten im Anschluß an den Genuß von *Leberwurst* auf, die allem Anscheine nach aus *Fleisch und Organen eines krank gewesenen Schweines* gefertigt worden war. Aus einer Leiche wurden Paratyphusbakterien gezüchtet, die von den Seren der erkrankt Gewesenen in Verdünnungen bis 1 : 500 agglutiniert wurde.

Karsten und *Ehrlich* haben folgenden Fall mitgeteilt:

„Dem Provinzialuntersuchungsamt in Hannover wurde im August durch die städtische Polizei geräucherte Mettwurst zur Untersuchung übersandt, nach deren Genuß mehrere Personen schwer an Durchfall und Fieber erkrankt waren, so daß in allen Fällen ärztliche Hilfe in Anspruch genommen werden mußte. Die Nachforschungen ergaben, daß die Wurst von einem *notgeschlachteten Schweine* stammte. Über die Krankheit und den Schlachtbefund konnte nichts Näheres ermittelt werden. Der Fleischer, der das Schwein schlachtete, hatte von dem Hackfleisch genossen und war als erster erkrankt, danach noch 7 andere Personen, die erst nach mehrtägigem Erkranktsein wieder genasen. In den Stuhlproben eines erkrankten Kindes wurden im Medizinaluntersuchungsamt in Hannover reichlich *Paratyphuskeime* festgestellt.

Das Tierseucheninstitut erhielt eine einpfündige Mettwurst, die appetitlich aussah, würzig roch und aus gewiegtem Schweinefleisch und Schweinefett bestand. Das Fleisch war von saurer Reaktion gegenüber Lackmus, bei Anstellung der Eberschen Fäulnisprobe stiegen leichte Nebel auf. Auf den mit Fleischteilchen der Wurst beimpften Endoagarplatten wuchs ein Bakteriengemisch von rötenden und nichtrötenden Kolonien. Die farblos wachsenden Kolonien, die abgeimpft und näher bestimmt wurden, erwiesen sich als *Paratyphusbacillen*.

Nach den Erkrankungen infolge des Wurstgenusses hatte einer der Patienten einige Stücke Wurst in einen Abfalleimer geworfen, dessen Inhalt als Schweinefutter verwendet werden sollte. Das Futter hatte die Nacht über (im Sommer) gestanden und war früh verfüttert worden. *Die beiden damit gefütterten Schweine erkrankten am selben Tage.* Sie fraßen nicht, hatten Erbrechen und zeigten eine fieberhafte Temperaturerhöhung über 41°. Von den beiden Schweinen wurden 12 Tage nach der Erkrankung von uns Blut- und Kotproben entnommen. Mit dem aus der Wurst gezüchteten Stamme agglutinierte die Blutprobe des einen erkrankten Schweines noch in der Verdünnung von 1 : 160, die des anderen Schweines noch in der Verdünnung von 1 : 320, während mit dem Bac. Paratyphi B-Schottmüller beide Proben nicht agglutinierten. Im Kote der Schweine konnten Paratyphuskeime nicht ermittelt werden.

Der vorstehende Fall ist äußerst lehrreich, weil er, abgesehen von der Erkrankung auch des Metzgers, nicht nur die Pathogenität der Paratyphusbakterien der Wurst, die von einem *notgeschlachteten* Schweine stammt, zeigt, sondern auch die Pathogenität der gleichen Bakterien für Schweine durch Fütterung dergestalt, daß zwei Schweine vorübergehend erkrankten. Wären diese beiden Schweine alsbald geschlachtet und die Organe und das Fleisch roh oder ungenügend erhitzt in Form von Fleischwaren genossen worden, so hätten auch hier wieder neue Paratyphusinfektionen beim Menschen entstehen können.

Pfeiler und *Engelhardt* haben einen interessanten Fall mitgeteilt, der die Pathogenität eines Para-B-Stammes für *Rinder*, *Schweine*, *Hunde und den Menschen* belegt.

Das Fleisch eines intravital mit Paratyphusbakterien infizierten Rindes führte in Bobrau zur Erkrankung der Mitglieder von 3 Familien. Der das Fleisch roh verzehrende Hund ging ein. 9 Schweine und 1 Rind, die das Blutwasser des notgeschlachteten Rindes aufgenommen hatten, erkrankten an Fieber und unstillbarem Durchfall neben Freßunlust. 2 Schweine und das Rind gingen an einer Paratyphusinfektion ein. In den verendeten Schweinen, dem verendeten Rinde und dem notgeschlachteten Rinde wurden *echte Paratyphusbakterien* vom Schottmüller-Typus gefunden, die vom Blutserum erkrankt gewesenen Personen in hohen Verdünnungsgraden agglutiniert wurden.

Man wird diesen Fall wohl kaum dahin deuten können, daß der Genuß des intravital mit Paratyphusbakterien infizierten Schweinefleisches unschädlich für den Menschen gewesen wäre, wenn es durch irgendwelche Umstände vom Menschen genossen worden wäre.

Das Vorkommen latenter Paratyphusinfektion bei gewerblich geschlachteten Schweinen belegt auch folgender Fall, der mir während der Niederschrift unterbreitet wurde:

Ein Metzger in Seibelsdorf schlachtete am 18. September 1924 einen Jungstier und ein Schwein. Beide Tiere wurden bei der Beschau als *volltauglich* begutachtet. 30 Pfund Schweinefleisch und 4 Pfund Stierfleisch wurden zu Bratwürsten verarbeitet. 1 Person, die das Wurstbrat bei der Herstellung kostete, erkrankte. 1 Person, die 2 Bratwürste roh verzehrte, erkrankte und starb. 3 weitere Personen,

die Würste gesotten und gebraten genossen hatten, erkrankten ebenfalls. Die übrigen Personen, die von den 320 Bratwürstchen genossen hatten, erkrankten nicht. Bei der gestorbenen Person wurde *Paratyphus* bakteriologisch festgestellt.

Ein anderer Metzger hatte die eine Hälfte des Jungstieres übernommen und mit *anderem* Schweinefleisch ebenfalls Bratwürste hergestellt. Nach dem Genuß dieser Würste erkrankte *niemand.* Die Ursache der Erkrankung des Menschen war also nicht in dem Jungrindfleisch, sondern in dem *Schweinefleisch* zu suchen, das der erste Metzger, nachdem es als volltauglich begutachtet war, verwendet hatte.

Die Erklärung für das Zustandekommen der Infektionen beim Menschen wurde aber infolge der Anschauung, daß die Fleischvergiftung aus der Blutvergiftung entstehe, von den Sachverständigen vor Gericht nicht in der oben hervorgehobenen Richtung gesucht.

Der erste Metzger hatte nämlich 4 Tage vorher eine Kuh infolge von Schwergeburt und Uterusverletzung schlachten und verpfunden müssen. Die Untersuchungsstelle, die die Paratyphusinfektion des gestorbenen Menschen festgestellt hatte, gab ihr Gutachten von der Blutvergiftungslehre ausgehend dahin ab, daß der Metzger höchstwahrscheinlich Fleisch der notgeschlachteten Kuh verwendet habe. „Paratyphus sei eine bei Kühen, insbesondere Kälberkühen, häufige Erkrankung." Der Beweis für diese Annahme konnte nicht erbracht werden, zumal sich der Genuß des Fleisches dieser ausgepfundeten Kuh bei allen Konsumenten als unschädlich erwiesen hatte. Der tierärztliche Gutachter suchte die Infektion in dem Fleische des *Jungstieres*, weil der Metzger angegeben hatte, daß das zerkleinerte Fleisch des Stieres nicht fest gewesen sei, sondern etwas getropft habe, ein Befund, der lediglich für die Wurstbereitung dergestalt von Bedeutung war, daß das Brat weniger Wasser zu binden in der Lage war. Auch diese Annahme des tierärztlichen Gutachters war falsch, weil bei einer Infektion des Fleisches des Jungstieres auch die Bratwürste des anderen Metzgers sich als schädlich hätten erweisen müssen, was aber nicht der Fall war. Folglich kann der Fall nur durch die *latente* Infektion des einen geschlachteten Schweines erklärt werden. Der Metzger der zur Rechenschaft gezogen wurde, kann natürlich für das Nichterkennen einer dem Fleische gesund erscheinender Tiere innewohnenden Schädlichkeit, die auch der Tierarzt und Arzt ohne bakteriologische Untersuchung nicht erkennen kann, nicht verantwortlich gemacht werden. Der Fall zeigt aber wieder, wie die Lehre der Unschädlichkeit des Fleisches paratyphusinfizierter Schweine in Verbindung mit der Blutvergiftungslehre vor Gericht zu Fehlurteilen führen muß, wenn die Gutachtertätigkeit von Fehlannahmen ausgeht, und wenn nicht an die Stelle der Blutvergiftungslehre die mit den nachweisbar gewesenen

Tatsachen in Einklang stehende Infektionslehre tritt, die den Paratyphusinfektionen der Schweine keine Sonderstellung zuweist.

Schließlich teilte *Demnitz* Beobachtungen über die Übertragbarkeit des Bac. suipestifer auf den Menschen durch den Genuß von Rollschinken mit. Die Rollschinken stammten von Schweinen, die wegen Virusseuche notgeschlachtet worden waren. Der ganzen Sachlage gemäß waren die Schweine gleichzeitig mit Suipestiferbakterien seuchenhaft infiziert. Nach dem Genuß von rohem Rollschinken erkrankten 25 Personen an Gastro-Enteritis.

Aus der Zusammenstellung von *Kupplmayr* über Fleischvergiftungen in den Jahren 1913—1922, erscheinen mir folgende Fälle als besonders erwähnenswert für das Vorliegen *intravitaler auf den Menschen übertragbar gewesener Paratyphusinfektionen* des Schweines:

1913, *Fall 8:* Brandis (Sa.), 5 Erkrankungen durch Genuß von *Schweinefleisch.* Bac. paratyphi B in Fleischresten und im Stuhl der Patienten.

1914, *Fall 14:* Schweickersheim (Döbeln Sa.), 132 Erkrankungen nach Genuß des Fleisches *zweier Schweine, die bei der Beschau nicht zu beanstanden waren.* Bei der Fleischbeschau wurden die Schweine *völlig gesund* befunden. Bac. paratyphi B in Fleisch und Wurst und bei den erkrankten Personen.

1921, *Fall 62:* Gleiwitz, 7 Erkrankungen und 1 Todesfall durch Genuß von *Schweinefleisch. Hausschlachtung.*

1921, *Fall 92:* Altona, 4 Erkrankungen nach dem Genuß von *geräucherten Schweineschinken.* Paratyphus B in den Schinkenresten.

1922, *Fall 93:* Bogenschütz (Oppeln), 20 Erkrankungen, 2 Todesfälle nach Genuß von *Schinken, Rauchfleisch vom Schweine* und angebratenem Schweinefleisch. Bac. paratyphi B im Darm der Verstorbenen und *im Rauchfleisch.*

1922, *Fall 120:* Wülfel (Hannover), 37 Erkrankungen nach Genuß von *Schweinefleisch. Mettwurst. Notschlachtung* angeblich wegen Verstopfung. Ohne Fleischbeschau. Verarbeitung des Fleisches in einem Wohnzimmer. Fleischvergifter in der Wurst.

Nach einer Zusammenstellung des Reichsgesundheitsamtes entfielen von den im Jahre 1923 gemeldeten Fleischvergiftungen *15 Erkrankungsfälle auf den Genuß von Schweinefleisch.* Auf Wurstgenuß stellten sich 1105 Erkrankungen ein. Hauptsächlich handelte es sich hierbei um folgende Wurstsorten: Mettwurst 432, Sülze 285, Lungenwurst 150, Schwartenmagen 60, Leberwurst 52, Zervelatwurst 50, Blutwurst 26 und Zungenwurst 5 Erkrankungen. Wie früher war auch 1923 die Mehrzahl aller Erkrankungen, und zwar 59% aller Krankheitsfälle, auf den Genuß von *rohem Hackfleisch* (alle Tierarten eingerechnet) zurückzuführen.

Aus der Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene und einer Zusammenstellung *Hübeners* entnehme ich noch folgende Fälle, die die Pathogenität *intravital infizierten Schweinefleisches für den Menschen* ebenfalls zu beleuchten vermögen:

In Burgsinn bei Würzburg erkrankten etwa 200 Personen an Paratyphus nach Genuß von Wurst, die ein Metzger aus dem Fleisch eines vermeintlich an

Rotlauf, also jedenfalls offensichtlich erkrankt gewesenen Schweines hergestellt hatte (**33**, 194. 1923). In Königswusterhausen erkrankten 40 Personen nach Genuß von *Braunschweiger Wurst*, in der Paratyphusbakterien ermittelt wurden (**34**, 29. 1924).

In Hohnstein erkrankten 60 Personen nach dem Genuß sog. *polnischer Wurst*, die aus Kalb- und *Schweinefleisch* hergestellt war. Im Haushalte des Landwirtes, in dem die 2. Hälfte des Kalbfleisches verzehrt worden war, erkrankte niemand, so daß die Infektionsquelle im *Schweinefleisch* zu suchen war (**35**, 16. 1925).

In Weichs (O.-Pfalz) erkrankten 50 Personen nach dem Genuß von *Leberwurst und Preßsack*, den ein Metzger angefertigt hat. (**35**, 16. 1925.)

Nach Warneck erkrankten durch den Genuß von *Schweinebraten* eine Anzahl Personen. Im *Fleisch* wurde ein *Para-B-Bacillus gefunden*. (**24**, 554. 1914.)

In Waschwitz starb eine Person nach dem Genuß *geräucherten Schinkens*, der aus einer *Hausschlachtung* stammte. (**22**, 66. 1921.)

In Paris erkrankten 180 Soldaten des 103. Infanterie-Regimentes nach Genuß von *Schweinefleisch*. (**20**, 215. 1910.)

In Wiersen erkrankten nach Genuß von *Schweinefleisch* eines zum Hausgebrauch geschlachteten *Schweines* 5 Kinder, von denen 2 starben. (**18**, 170. 1908.)

In Oschersleben erkrankten nach Genuß von *gehacktem Schweinefleisch* 10 Personen. (**17**, 298. 1907.)

In Sandorf erkrankten gelegentlich eines Hochzeitsschmauses 45 Personen. Der Brautvater hatte die Hälfte eines nicht untersuchten Schweines gekauft. (**16**, 109. 1906 und nach *Hübener*.)

In Gunzenhausen erkrankten nach einem Hochzeitsschmause 15 Teilnehmer, von denen einer starb. Es erkrankten nur solche Personen, welche *Schweinefleisch* genossen hatten. (**15**, 38. 1905.)

In Karlsruhe erkrankten nach dem Genuß von *Schinken* 23 Kadetten an Infektionen durch den Bacillus enteritidis Gärtner; fernerhin in Metz 88 Militärpersonen nach dem Genuß von *Speck*. (1905 nach *Hübener*.)

In Ochsenhausen erkrankten infolge des Genusses von Fleisch eines *notgeschlachteten Schweines* zahlreiche Personen. (**14**, 31. 1904.)

In Greifenberg erkrankte eine Gutsbesitzers-Familie schwer nach dem *Genusse von Wurst*. Der Gutbesitzer starb. (**13**. 1903.)

In Gnesen erkrankten 40 Soldaten eines Regimentes nach dem Genuß von *Schweinefleisch*; 1 Todesfall. (1903, nach *Hübener*.)

In Halle erkrankten mehrere Personen nach Genuß von *Schweinefleisch*, welches mit dem *Bacillus enteritidis infiziert* war. (1901, nach *Hübener*.)

In Friedrichswalde erkrankten 40—50 Personen nach dem Genusse von *Wurst*, die aus dem Fleisch eines gesunden und eines längere Zeit krank gewesenen Schweines hergestellt worden war. (**8**, 38. 1898.)

In Usseln erkrankten 15 Personen nach dem Genuß des Fleisches eines *notgeschlachteten Schweines*; 1 Person starb. (**8**, 239. 1898.)

In Ringelheim erkrankten 15 Personen nach dem Genuß von *Sülze* eines unter rotlaufverdächtigen Erscheinungen *notgeschlachteten Schweines* (nach *Hübener*, 1898—1900).

In Tilsit erkrankten 66 Soldaten nach dem Genuß von *Schweinefleisch*, das ihnen auf dem Bahnhof verabreicht wurde (nach *Hübener*, 1898—1900).

In Altona erkrankten 181 Soldaten nach dem Genuß von *Rind-* und *Schweinefleisch* (nach *Hübener*, 1898—1900).

In Bischofswerda erkrankten über 100 Personen nach dem Genuß von *Knack- und Mettwürsten*, zu deren Herstellung das Fleisch eines *notgeschlachteten Schweines* verwendet worden war. (**6**, 32. 1890.)

In 4 Ortschaften des Kreises Kempen erkrankten über 100 Personen nach dem Genuß von *Schweinefleisch und Würsten*. 1 Todesfall. Das in Frage kommende Schwein soll bei der Schlachtung *keine* erkennbaren krankhaften Erscheinungen gezeigt haben.

Ich glaube, daß die vorstehende Zusammenstellung von Fällen in Verbindung mit dem Ergebnis der Epidemiologie vom statistischen Gesichtspunkte aus sehr wohl geeignet sein dürfte, die in der Überschrift gestellte Frage nunmehr feststehend dahin zu beantworten, *daß das Fleisch intravital mit Paratyphusbakterien infizierter Schweine eine Gefahrenquelle für Menschen bildet und umgekehrt, daß ein Teil der Paratyphuserkrankungen des Menschen auf den Genuß von Fleisch intravital paratyphusinfizierter Schweine zurückzuführen ist.*

Von diesem Gesichtspunkte aus findet auch die *Fleischvergiftung zu Middelburg im Jahre 1874* ihre Erklärung. Hier erkrankten im März 1874 349 Personen, von denen 6 starben, nach dem Genuß von *Leberwurst*, die alle Erkrankten aus demselben Metzgerladen bezogen hatten. Nur bei 6 Personen hatte der Wurstgenuß keine schädlichen Folgen. In der Regel genügte der Genuß einer Scheibe Wurst, um eine Erkrankung auszulösen. In einigen Fällen führte auch der Genuß von Speck, Fett und Leber aus derselben Metzgerei zu gleichen Erkrankungen. Die konstantesten Krankheitserscheinungen waren Leibschmerzen, Erbrechen, anhaltende Diarrhöe, heftigen Durst und Fieber, also *paratyphöse* Erscheinungen. Die Schweine, aus denen die 30 Kilo Leberwurst bereitet wurden, waren von einem Tierarzt bei der Beschau als frei von erkennbaren krankhaften Veränderungen und als vermeintlich gesund befunden worden. *Th. Husemann* gab seiner Zeit schon der Ansicht Ausdruck, daß hier eine Vergiftung durch das Fleisch „krank" gewesener Schweine vorlag, eine Ansicht, der auch *v. Bollinger* beipflichtete und die sich auch auf Grund der vorliegenden Darlegungen als richtig erweisen durfte.

Um weitere Einwendungen der Vertreter der dualistischen Anschauung zu verhindern, will ich kurz darlegen, warum diese dem Schweinefleisch ganz zweifelsohne innewohnende Gefahrenquelle für den Menschen trotz der zahlreichen Einzelbeobachtungen immer wieder übersehen und bestritten wurde.

Zunächst paßte das Vorkommen anatomisch nicht erkennbarer Paratyphusinfektionen nach der Lehre von der Entstehung der Fleischvergiftungen aus der sog. eitrig-jauchigen Blutvergiftung der Schlachttiere nicht in die bisherige der Fleischbeschau zugrunde liegend rein pathologisch anatomische Denkweise, die aus dem Schlachtbefund die Diagnose und die Schädlichkeit des Fleisches erkennen zu können glaubte. Ich habe dies in dieser Zeitschrift in einer vorangegangenen Abhandlung über den nichtbestehenden Zusammenhang zwischen der

sog. eitrig-jauchigen Blutvergiftung der Tiere und der Fleischvergiftung des Menschen, wie auch in der tierärztlichen Fachpresse eingehender dargelegt. Eine eitrig-jauchige Blutvergiftung der Schweine, die bei der Fleischbeschau in Form der anatomischen Blutvergiftung erkennbar sein sollte, trat zudem bei den Schweinen im Gegensatz zu anderen Schlachttierarten so gut wie nicht in Erscheinung. Zudem bestand die Neigung, alle Paratyphuserkrankungen des Menschen nach Wurstgenuß, nach Hackfleischgenuß, nach Schinken und Geräuchertem als *postmortale Infektionen* mit den als *ubiquitär* angesprochenen Bakterien der Paratyphusgruppe zu erachten. Eine scharfe Grenze zwischen den paratyphösen Erkrankungen des Menschen zu ziehen, die durch *intravitale* und *postmortale* Infektion von Schweinefleisch bewirkt worden sind, ist aber schwer, wenn jeder zu erhebende Einwand gegen das Vorliegen einer intravital erfolgten Infektion von Schweinefleisch ausgeschlossen sein soll. Die Gefahrenquelle, die für den Menschen in *intravital* mit bipathogenen Paratyphusbakterien infiziertem Fleische liegt, ist aber auch wieder um so größer und die Fälle selbst werden um so weniger als auf intravitaler Infektion beruhend erkenntlich, *je mehr Fleisch und Organe infizierter Schweine zu Leberwurst, Mettwurst, Salami- und Zervelatwurst zu Preßkopf, Schwartenmagen, Lungen- und Blutwurst, zu Sülze, Pastete, zu Hack- und Schabefleisch, zu Pökel- und Räucherfleisch verarbeitet worden ist, oder wenn das Fleisch längere Zeit hängen bleibt, bevor es in der Küche zubereitet wird.* Die Verarbeitung infizierten Schweinefleisches zu Rohwürsten, zu Brühwürsten — diese erreichen im Innern Temperaturen, die nur wenig über Brutwärme liegen — zu Pökelware und Hack- und Schabefleisch schafft aber äußerst günstige Bedingung für die Vermehrung zunächst vielleicht nur spärlich vorhandener Keime; ja es wird bei den Würsten und dem Hackfleisch noch die Gelegenheit zur Mitinfektion des zugefügten Fleisches anderer gesunder Schlachttiere gegeben. Bleibt dieses Fleisch dann noch einige Zeit bei warmer Temperatur liegen, so erklärt sich hierdurch die besondere pathogene Wirkung dieser Fleischprodukte insbesondere im Sommer beim Genuß durch den Menschen, im Gegensatz zu der zu beobachtenden Unschädlichkeit des küchenmäßig gründlich gekochten und gebratenen Fleisches alsbald nach der Schlachtung verzehrten aber latent infiziert gewesenen Schweinefleisches. Die *Schädlichkeit* des Fleisches paratyphusinfizierter Tiere tritt eben bei Sterilisation des Fleisches nicht in Erscheinung. Man kann daher den Umstand, daß das Fleisch zahlreicher Schweine mit sog. bacillärer Schweinepest ohne Schaden für den Menschen verzehrt wird, auch wenn es intravital infiziert war, *nicht* als Beweis für die *generelle* Unschädlichkeit dieses Fleisches und der Paratyphusbakterien der Schweine anführen, wohl aber hat dieses Vorgehen dazu beigetragen,

die Schädlichkeit der suilen Paratyphusbakterien für den Menschen zu verkennen.

Die Erkennung der Paratyphusbakterien des Schweines als unter besonderen Umständen für den Menschen pathogen, ist aber für die weitere Klärung des Paratyphusproblemes und für die Beseitigung des verwirrenden Durcheinanders in allen hierhergehörigen Grundfragen notwendig. — Kein Bacillus ist in der Bakteriologie so oft immer wieder unter anderen Namen entdeckt und gefunden worden wie gerade der *Paratyphusbacillus.* Ursprünglich als *Hog-cholera-Bacillus beim Schweine von Salmon und Smith 1885 in verschiedenen Typen gefunden,* wurde er als der vermeintliche Erreger der in ihrem Wesen noch ungeklärten *Virusseuche* der Schweine erachtet, und als *Bacillus suipestifer* auch zum Erreger der deutschen Schweinepest gestempelt, bis sich auch diese in ihrem Wesen als *Virusseuche* erwies. Durch die Untersuchungen von *Damman* und *Stedefeder, Glässer* u. a. wurde dann der Virusseuche wieder mehr und mehr eine *bacilläre Form der Schweinepest* entgegengestellt, die sich bei weiteren Forschungen als durch *mehrere Typen von Bakterien der Paratyphusgruppe* erzeugt, erwies.

Als *Achard* und *Bensaude* und *Schottmüller* die Paratyphusbakterien als Erreger paratyphöser Erkrankungen unklarer Herkunft beim Menschen fanden, waren diese Bakterien somit schon längst als Erreger von Fleischvergiftungen und Erreger von Tierkrankheiten unter anderen Namen bekannt. Bei Mensch und Tier zeigte es sich nun immer mehr, daß der Paratyphus als Krankheitsbegriff ätiologisch durch eine Reihe von Typen bedingt war und daß bei Menschen und Tieren gleichartige Typen von Paratyphusbakterien vorkommen. Die gegenseitigen Beziehungen zwischen den Paratyphusinfektionen des Menschen und der Tiere blieben aber insbesondere deshalb unklar, weil das Hauptstreben vieler Bakteriologen darauf hinausging, die gefundenen Typen der Paratyphusbakterien in nur menschenpathogene und nur tierpathogene Typen scheiden zu wollen. So blieben insbesondere auch die Beziehungen der Paratyphosen des Menschen zu den Infektionen der Schweine mit Hog-cholera-Bacillen ungeklärt, wiewohl insbesondere durch *Uhlenhuth* und seine Mitarbeiter auf die nicht seltene Vergesellschaftung der Virusseuche mit paratyphösen Infektionen der Schweine hingewiesen wurde.

Die zum Dogma erhobene Lehre von der Entstehung der Fleischvergiftungen des Menschen aus den eitrig-jauchigen Blutvergiftungen der Schlachttiere war es, die immer wieder dazu führte, daß der von Natur aus gegebene Zusammenhang der Paratyphusinfektionen der Schlachttiere mit bestimmten Paratyphuserkrankungen des Menschen trotz meines ständigen Hinweisens hierauf als nicht gegeben erachtet wurde. Die Infektionen der Schlachttiere, und insbesondere der Schweine,

wurden ex cathedra als unschädlich für den Menschen erklärt und die aufgestellte Behauptung vom Laboratorium aus zu beweisen gesucht. Daß eine vorwiegende Gattungspathogenität dieser oder jener Type gegeben sein kann, ist nicht zu bestreiten, z. B. Unempfänglichkeit der Tiere für den Bac. typhi, wohingegen aber alle Paratyphusbakterien des Menschen auch beim Schweine schon gefunden worden sind.

Durch die Lehre von der Unschädlichkeit der seuchenhaft bei Tieren und insbesondere Schweinen vorkommenden Paratyphusinfektionen für den Menschen ist der Förderung des allgemeinen Volkswohles aber kein guter Dienst erwiesen worden. Darüber kann ja doch wohl kein Zweifel mehr bestehen, daß die intravitale Infektion von Schlachttieren mit Bakterien der Paratyphusenteritisgruppe sich beim Menschen durch den Genuß des Fleisches dieser Tiere in einer geradezu katastrophalen Form und zwar — wenn auch glücklicherweise nicht häufig, so doch leider zuweilen — als *Massenparatyphus tierischer Herkunft* äußert. Die Tatsache, daß intravital mit Paratyphusbakterien infiziertes Schweinefleisch die Entstehung *suiler Paratyphosen beim Menschen* zu bewirken vermag, kann aber vom experimentellen Standpunkte des Laboratoriums aus nicht widerlegt oder als unzutreffend bezeichnet werden; denn hier können keine Versuche angestellt werden, die den positiven epidemiologischen Tatsachen gleichkommen, die uns die Natur immer wieder vor Augen führt.

Ein von *Bontemps* mitgeteilter Fall einer Laboratoriumsinfektion mit dem Bacillus suipestifer kann hiernach nicht mehr als mit den Tatsachen in Widerspruch stehend aufgefaßt werden. — Was den von *Erben* mitgeteilten Fall einer Gruppenerkrankung durch den Genuß der Eingeweide pestkranker Schweine anbelangt, so stimme ich hier allerdings *v. Ostertag* bei, daß dieser Fall in seiner Darstellung so widerspruchsvoll und unklar ist, daß die Erkrankungen der Menschen nicht als Paratyphus suiler Herkunft aufzufassen sind. Ich muß aber *v. Ostertag* widersprechen, wenn dieser Fall als wichtiges Gegenargument dafür angeführt wird, daß der intravitalen Infektion des Schweinefleisches keinerlei pathogenetische Bedeutung für den Menschen zukomme. Die epidemiologischen *positiven* Tatsachen lassen einen ablehnenden Standpunkt in dieser Frage nicht zu. Sie bilden den Beweis dafür, daß das Fleisch paratyphusinfizierter Schweine schädlich für den Menschen sein kann, daß also tierische Paratyphusinfektionen unter günstigen Umständen vom Tier auf den Menschen übertragbar sind, und hier in Form des Paratyphus dann in Erscheinung treten. Daß daneben andere Infektionsquellen und Kontakinfektionen insbesondere von Mensch zu Mensch direkt oder indirekt in Frage kommen können, ist selbstverständlich.

G. Mayer hat hinsichtlich des Auftretens paratyphöser Darmerkrankungen darauf aufmerksam gemacht, daß die örtliche Verteilung dieser

Fälle beim Menschen im Gegensatz zum Typhus ganz regellos ist. Bestimmte Krankheitszentren, endemische Herde ließen sich nach *Mayers* Beobachtungen nicht feststellen. Nur eine Erscheinung drängte sich immer wieder auf: Das Zusammengehen der Darmerkrankungen des Menschen mit der Schweinehaltung. Während *Mayer* Erkrankungen an Paratyphus unter der städtischen Bevölkerung, namentlich der besseren, welche keine Schweinezucht betrieb, nur vereinzelt und Paratyphusträger nur sporadisch auftreten sah, traf die übergroße Mehrzahl der Fälle von Erkrankungen und Träger auf die ländliche, besonders auf die Schweinezucht treibende Bevölkerung und hier wieder besonders auf die Kinder.

Prigge und *Sachs-Mücke* haben beobachtet, daß dort, wo gesunde Bacillenausscheider vorgefunden wurden, in über der Hälfte der Fälle auch bei anderen Familienmitgliedern oder Kostgängern Paratyphusbacillen nachgewiesen werden konnten. In einem Typhusverdachtfalle stellten sie zwei Familienmitglieder und das *Schwein* dieser Familie als *Paratyphusbacillenträger* fest. Daß eine Wechselbeziehung zwischen einer Reihe von Paratyphusinfektionen des Menschen und denen der Schweine besteht, erscheint daher nicht nur möglich, sondern sehr wahrscheinlich zu sein.

Auch die Befunde von Suipestifer-, Voldagsen- und C-typen, die von einer Reihe von Autoren (*Geißler*, *P. Neukirch*, *Weil* und *Sachs*, *Neustadt* und *Steiner*, *Kaunitz* und *Trawinsky*, *Materna* und *Januschke*) bei paratyphösen Erkrankungen des Menschen gefunden wurden, dürften wohl in irgend welchen Beziehungen zur analogen Infektion der Schweine gestanden sein, wenn auch eine Kontaktinfektion oder alimentäre Infektion durch Fleischgenuß hier nicht nachweisbar war. Die innigen Beziehungen zwischen den Insassen der menschlichen Behausung und jener für Schweine sind insbesondere auf dem Balkan und auch anderswo zur Genüge bekannt. — Daß bei der großen Vorliebe des Deutschen für rohes Schweinefleisch und Wurst, gerade das Schweinefleisch mit latenten bei der Fleischbeschau nicht erkennbaren Paratyphusbakterien äußerst gemeingefährlich für den Menschen werden kann, erkennen wir allerdings erst deutlich und klar, wenn die Lehre von der Unschädlichkeit der im Schweinefleisch vorkommenden Paratyphusbakterien fällt. Dann erklärt sich auch, weshalb gerade Deutschland als das „klassische Land der Fleischvergiftungen" bezeichnet wird. Die Infektionen tierischen Ursprunges sind anderwärts seltener als in Deutschland, weil man hier weniger rohes Fleisch und Eingeweidewürste als in Deutschland zu essen pflegt, wodurch die Infektionsgefahr für die Erwerbung des tierischen Paratyphus durch den Menschen wesentlich herabgemildert wird. In der Erkennung der Bedeutung des tierischen Paratyphus für den Menschen wiederholt sich das gleiche wie bei der Trichine,

die jahrzehntelang als harmloser Muskelschmarotzer angesprochen wurde, bis *Zenker* die Gefährlichkeit der Trichine unter dem Bilde eines „Pseudotyphus“ erkannte.

Auch die Verbreitung der Paratyphusbakterien in der Außenwelt und das nicht seltene Auftreten der Paratyphusbakterien beim Schwein als auch bei anderen Schlachttieren dergestalt, daß zwischen dem relativ häufigen Vorkommen dieser Bakterien und dem seltenen Auftreten der Fleischvergiftungen keine klar erkennbare Relation zutage tritt, führten mit zu dem Streben, die Paratyphusbakterien in tier- und menschenpathogene Typen zu scheiden. Und so wenig eine vorherrschende Gattungsaffinität einzelner Typen zu bestreiten ist, wie die scheinbar reine Menschenpathogenität des Typhusbacillus, so wenig gelingt es, die häufigsten tierischen Typen, insbesondere jene der Schlachttiere, als nur tierpathogen auf dem Wege der Laboratoriumsforschung zu erkennen. Nach den Einzelergebnissen der Fälle der vorliegenden Kasuistik haben sich *alle bis jetzt beim Schwein gefundenen Typen von Paratyphusbakterien als bipathogen für Mensch und Schwein erwiesen* und *Pfeiler* hat gewiß nicht recht, wenn er behauptet, es seien Fleischvergiftungsepidemien durch Ferkeltyphusbacillen bzw. den Voldagsentypus überhaupt noch nicht bekannt geworden. Die Voldagsen- bzw. Ferkeltyphusbacillen seien nicht zu den fleischvergiftenden Bakterien zu rechnen. Ich glaube nicht, daß jemand in der Lage ist, die Beweiskraft des hier vorgelegten Materiales hinsichtlich der zutage getretenen Pathogenität der verschiedenen Typen der Paratyphusbakterien des Schweines für den Menschen zu entkräftigen. Ob dabei in dem einzelnen Falle nun diese oder jene Type vorlag, ist für die große, allgemeine Frage der *Übertragbarkeit suiler Typen* auf den Menschen ziemlich bedeutungslos. Ich habe daher auch nicht die Typenfrage in den Vordergrund gestellt, sondern die weitergreifende Frage, ob Fleischvergiftungen beim Menschen beobachtet worden sind, die auf den Genuß intravital infizierten Schweinefleisches mit Bakterien der Paratyphus-Enteritisgruppe zurückzuführen sind.

Die Infektionen der Schweine mit Paratyphusbakterien bieten, wie die Einzelfälle der Kasuistik zeigen, *nichts Typisches*, das diese Infektionen irgendwie mit Sicherheit durch die Beschau erkennen ließe. Diese Erkrankungen sind daher nicht als „typische“ zu bezeichnen, sondern es handelt sich hier lediglich um „spezifische“ Infektionen. Der Paratyphus der Schweine ist ein *rein bakteriologischer* aber kein klinischer oder pathologisch-anatomischer Begriff. Eine Erkennung dieser Infektionen mit der für die Fleischbeschau notwendigen Sicherheit ist mithin pathologisch-anatomisch nicht möglich. Hierauf hat neuerdings auch *R. Manninger* in einer Abhandlung über den akuten Paratyphus der Ferkel hingewiesen. Die Paratyphusinfektionen der

Schweine können aber auch nicht durch Vorschriften im Rahmen der Blutvergiftungslehre bei der Fleischbeschau erfaßt werden. Ich betone das besonders im Hinblick auf die Verantwortungsfrage der Tierärzte, auf die ich hier nicht näher eingehen will. Eine bakteriologische Untersuchung aller Schweine auf das Vorliegen irgend welcher Paratyphusinfektionen, wie dies hinsichtlich der Ermittelung von Trichineninfektionen bei den Schweinen teils durch landespolizeiliche, teils durch ortspolizeiliche Vorschriften geschieht, dürfte nicht durch- und ausführbar sein. Der Erfassung *aller* Paratyphusinfektionen bei den Schweinen und damit der wirksamen Verhütung von Paratyphosen tierischer Herkunft beim Menschen durch Einführung der bakteriologischen Fleischuntersuchung stellen sich somit vorerst noch eine Reihe schwer überwindbarer Hindernisse in den Weg.

Immerhin muß aber, da sich nach den bisherigen Erfahrungen alle bei den Menschen gefundenen Typen von Paratyphusbakterien als vom Tier auf den Menschen übertragbar erwiesen haben, das Bestreben der Fleischbeschau darauf gerichtet sein, alle diese Fälle von Paratyphusinfektionen des Fleisches und der Organe der Schlachttiere unabhängig von der Typenfrage so *weitgehend als möglich zu ermitteln.* Von diesem Standpunkte ausgehend habe ich daher auch der Typenfrage für die Fleischbeschau im Gegensatz zu anderen Forschern keine besondere Bedeutung beigemessen. Die Fleischbeschau, insbesondere die bakteriologische Fleischuntersuchung, hat nicht einzelne Typen sondern *alle* Bakterien der Paratyphus-Enteritisgruppe in Fleisch und Organen weitmöglichst zu erfassen. Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen auf der Grundlage der bakteriologischen Fleischuntersuchung sind *Allgemeininfektionen* der Schlachttiere mit Paratyphusbakterien irgendwelchen Types *äußerst selten,* während vereinzelte Paratyphuskeime in Organen in etwa 2,5% der als verdächtig erachteten Fälle gefunden werden. Soll die Erkenntnis der Übertragbarkeit suiler und anderer Paratyphusbakterien in Fleisch und Organen der Schlachttieren bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung mit berücksichtigt werden, so hätte die allgemeine Formel für die Beurteilung ermittelter Paratyphusinfektionen der Schlachttiere lauten:

„Untauglich zum Genuß für den Menschen ist der ganze Tierkörper beim Vorliegen einer *Paratyphusseptikämie* unbeschadet der Tiergattung.“

„Bedingt tauglich (Kochen oder Dämpfen) ist das Fleisch solcher Schlachttiere, bei denen sich die *Muskulatur frei* von Paratyphusbakterien erweist, diese Bakterien sich aber in den Eingeweiden, Lymphknoten oder im Knochenmark nachweisen lassen (chronischer Paratyphus). Organe untauglich.“

Hiermit würden alle nachgewiesenen intravitalen Infektionen bei Pferd, Rind, Kalb, Schwein, Schaf, Ziege, Hund durch Bakterien der

Paratyphusgruppe (Bacillus enteritidis, paratyphi A und B einschließlich suipestifer und Voldagsen) einheitlich beurteilt, und es bliebe nur noch die Art und Weise der weitmöglichsten Erfassung dieser Fälle zu regeln. Vor allen Dingen aber wären hiermit endlich die Fleischvergiftungen als *spezifische* Infektionen des Menschen mit Paratyphusbakterien tierischer Herkunft von der eitrig-jauchigen Blutvergiftung losgelöst.

Wenn der Mensch vor den Gefahren geschützt werden soll, die ihm aus dem Genuß intravital mit Paratyphusbakterien infiziertem Fleisches der Schlachttiere drohen, so muß weiterhin die Frage beantwortet werden, warum die Paratyphusinfektionen der Schlachttiere sich nur selten als gemeingefährlich und in der Regel als ungefährlich oder wenig gefährlich für den Menschen beim Fleischgenuß erweisen.

Das *variable* Verhalten der gleichen Paratyphusbakterien, die das eine Mal als apathogen für Tier und Mensch, das andere Mal als hochpathogen für Tier und Mensch in Erscheinung treten, läßt sich mit der Infektionsdisposition des Individuums und einem rein mechanischen Eindringen oder Nichteindringen der Paratyphusbakterien in den Körper nicht erklären. Das Virulentwerden der Paratyphusbakterien, das zur Bipathogenität des Types für Tier und Mensch führen kann, ebenso wie die Apathogenität des gleichen Types für Tier oder Mensch ist nur durch ein in der Type selbst gelegenes *variables* Invasions- und Giftbildungsvermögen bei gegebener Infektionsdisposition des befallenen Körpers zu verstehen. Ist das Invasions- und Giftbildungsvermögen einer bipathogen veranlagten Type stark gesteigert, so kommt es bei den Tieren, insbesondere wenn auch hier infektionsbegünstigende Momente mitwirken, z. B. Virusseuche und kalter Stall, zu *Allgemeininfektionen*, die zu Notschlachtungen Veranlassung geben. Wird das Vorliegen solcher Infektionen dann mangels charakterischer Veränderungen bei der Fleischbeschau verkannt und das Fleisch als tauglich zum Genuß begutachtet, so treten die an Notschlachtungen sich anschließenden Fleischvergiftungen des Menschen in Erscheinung, sofern nicht eine vollständige Sterilisation des Fleisches bei der Zubereitung als üblich erfolgt ist. Wird das Tier nicht im *akuten* Stadium, während der Allgemeininfektion notgeschlachtet, und hat die Blutinfektion Zeit, abzuklingen, so daß sich die Infektion nur noch auf gewisse Prädilektionsorgane wie Leber, Milz und Lymphknoten beschränkt, so besteht bei der Verarbeitung derartig infizierter, gewerblich geschlachteter Schweine zu Wurst, Hackfleisch, wieder die Möglichkeit, einer starken postmortalen Durchwucherung der umgearbeiteten aber nicht sterilisierten Fleischmassen, im Anschluß an eine noch vorhanden gewesene intravitale Infektion einzelner Organe. Auf diese Weise sind die als Fleischvergiftungen angesprochenen Paratyphosen des Menschen nach Genuß *anscheinend gesunden Fleisches*

gewerblich geschlachteter, nicht krank gewesener Tiere zu erklären. Ist aber das Virulenzvermögen eines Types so stark gesunken, daß er keine latenten Infektionen des lymphatischen oder myeloischen Apparates des befallenen Tierkörpers mehr bewirkt, so haben wir es mit jenen Infektionen der Schlachttiere zu tun, die auch beim Menschen durch Fleischgenuß nicht mehr die Erscheinungen des toxischen, hochinfektiösen Paratyphus erzeugen, weil die Bakterien kein Invasionsvermögen besitzen. Ich habe dieses Verhalten beim Bacillus enteritidis in seinen verschiedenen Virulenzphasen im Anschluß an die St. Johanner Epidemie in Serienversuchen, die sich über einen Zeitraum von 4 Jahren erstreckten, tabellarisch darstellen können. — Bei den Typen die zu Fleischvergiftungen einmal Veranlassung gegeben haben, können wir also beobachten, wie der ursprünglich hochvirulente bipathogene Stamm schließlich avirulent wird, wohingegen der umgekehrte in der Natur sich abspielende Prozeß des Virulentwerdens der Paratyphusbakterien sich unserer Beobachtung verschließt, bis der Zufall bei gestiegener Virulenz plötzlich die Bipathogenität für Tier und Mensch in der Form sog. Fleischvergiftungen beim Menschen in Erscheinung treten läßt.

Schließlich hat auch noch die mannigfaltige Benennung der Paratyphusbakterien nach der Tierart oder dem Fundort dazu beigetragen, diese Bakterien zunächst als verschiedene spezifische Bakterienarten und als nur pathogen für die Tiergattung zu erachten, bei der sie gefunden wurde. Im Hinblick auf das Vorherrschen der Gattungspathogenität für eine Tiergattung ist es ja verständlich, wenn diese Gattungspathogenität für die Individuen dieser Gattung allein so lange als gegeben erachtet wird, als entgegenstehende Erfahrungen nicht vorliegen. Wenn man die wirklichen Fleischvergiftungen des Menschen als Paratyphosen *tierischen* Ursprunges bezeichnet, tritt die Pathogenität der Typen aus der B-Gruppe, Enteritisgruppe und Voldagsengruppe für Schlachttiere und den Menschen aber immer und immer wieder so klar in Erscheinung, daß ein Redressieren aller einmal als bipathogen für Tier und Mensch erkannten Typen als nur tierpathogen nicht weiter statthaben kann und darf, weil wir auf diese Weise nur den Fortschritt der Erkenntnis hemmen. *Der Paratyphus des Menschen steht ganz zweifelsohne in viel engerer Beziehung zum Paratyphus der Tiere als dies bisher immer wieder angenommen worden ist.*

Wir brauchen nur Fälle wie den Bobrauer Fall und einen von *Shibayama* mitgeteilten Fall zu betrachten, um zu der Erkenntnis kommen zu müssen, daß „Namen Schall und Rauch sind", die uns nur verwirren und daß nur die aus der Erfahrung sich ergebende Erkenntnis dazu führen kann, die Einfachheit des Schaltens und Waltens der Natur zu erkennen. „Die Natur bekümmert sich nicht um irgendeinen Irrtum; sie selbst kann nicht anders als ewig recht handeln, unbekümmert,

was daraus erfolgen möge.“ Wenn im Bobrauer Fall vom Rind ausgehend weitere Rinder, ein Hund, *Schweine* und *Menschen* infiziert worden sind und der Erreger nach *Pfeiler* und *Engelhardt echte Paratyphusbakterien* waren, wie sie beim Menschen gefunden worden waren, so hat es keinen Zweck, diesen Typus hier als nur tierpathogen und beim Menschen als nur menschenpathogen zu erachten und wenn in dem von *Shibayama* mitgeteilten Fall als „Mäusetyphusbakterien“ bezeichnete und zur Mäusetilgung bestimmte *Paratyphusbakterien* ein Pferd infolge Aufnahme dieser Bakterien zum Verenden brachten und der Genuß dieses Fleisches des Pferdes wieder 34 Personen an *Paratyphus* erkranken ließ, von denen eine Person starb, so hat es wieder keinen Zweck, den hier vorliegenden Typus als einen nur tierpathogenen Mäusetyphusbacillus bezeichnen zu wollen. Das gleiche gilt dann aber auch für die beim Schweine vorkommenden Paratyphusbakterien, die sich als auf den Menschen übertragbar erwiesen haben. Die Natur schematisiert bekanntlich nie!

So drängt alles immer wieder von neuem darauf hin, auch für die Paratyphusbakterien das gleiche Grundgesetz für gegeben zu erachten, wie für andere vom Tier auf den Menschen als übertragbar erkannte Bakterienarten; d. h. die vom Tier auf den Menschen als übertragbar erkannten Typen von Paratyphusbakterien, müssen wir in gleicher Weise als *einheitliche Typen* in biologischer und phylogenetischer Hinsicht erachten, wie wir dies für andere tier- und menschenpathogene Bakterien, z. B. den *Milzbrandbacillus*, den *Rotzbacillus* und den *Pestbacillus* tun. Diese erzeugen ja doch auch bei Tier und Mensch durchaus nicht gleichartig verlaufende Krankheitsprozesse und treten ja doch auch in Abhängigkeit von dem Grade der Virulenz und der Art der Infektion als bipathogen verschiedenartig und verschiedengradig in Erscheinung, ohne deshalb in tierische und menschliche bzw. nur tierpathogene oder nur menschpathogene Typen künstlich, im Widerspruch mit ihrer Naturveranlagung geschieden zu werden. Wie sich das Kommen und Vergehen der Seuchenzüge aus der vermehrten und verminderten physiologischen Disposition für diese Infektion und der gestiegenen und gesunkenen Virulenz des Infektionserregers für empfängliche Individuen erklärt, so sehen wir das gleiche Geschehen in kleinem Umfange sich bei den Paratyphusinfektionen der Tiere und des Menschen abspielen, sobald die seltene Wechselwirkung der Paratyphusbakterien in Form von Infektionen bei Tier und Mensch in Erscheinung tritt.

Gerade weil die Paratyphusinfektionen des Menschen im Gegensatz zum Typhus keine rein menschliche, sondern häufig vom Tier stammende, durch Fleischgenuß erworbene Kontagionen sind, kommt dem Zusammenhang dieser Infektionen des Menschen mit gleichartigen Infektionen

der Tiere eine wesentlich größere Bedeutung zu, als dies auf der Grundlage der Lehre von der Verschiedenheit tierischer und menschlicher Paratyphusbakterien immer wieder angenommen worden ist. Daß dann aber auch den *suilen* Infektionen hinsichtlich ihrer *Übertragbarkeit auf den Menschen* unter infektionsbegünstigenden Umständen *keine* Ausnahmestellung mehr einzuräumen ist, dürften die vorstehenden Darlegungen nunmehr wohl außer Zweifel gestellt haben.

Schlußfolgerungen.

Das Fleisch intravital mit Paratyphusbakterien infiziert gewesener Schweine hat sich in einer Reihe von Einzelfällen und Seuchenfällen als vom Schwein auf den Menschen übertragbar erwiesen. Auch von epidemiologischen Gesichtspunkten aus läßt sich die Ursache für Erkrankungen des Menschen infolge des Genusses von Schweinefleisch auf den Genuß des Fleisches notgeschlachteter, zuweilen auch gewerblich geschlachteter paratyphusinfizierter Schweine zurückleiten.

Die Paratyphusinfektionen des Menschen entstammen häufiger ätiologisch gleichartigen bei den Schlachttieren insbesondere auch bei den Schweinen vorhanden gewesenen Paratyphusinfektionen als dies bislang auf der Grundlage einer vermeintlichen postmortalen Infektion nichttierischen Ursprunges des Fleisches und einer vermeintlichen Verschiedenheit bei Tier und Mensch gefundener aber als nicht unterscheidbar angesprochener Typen von Paratyphusbakterien angenommen wurde. Ein Teil der durch Hackfleisch und Wurstgenuß erzeugten Paratyphusinfektionen des Menschen geht auf intravital erfolgte Paratyphusinfektionen von Fleisch und Organen *latent* infiziert gewesener Schlachttiere zurück, wobei die latente Paratyphusinfektion der *Schweine* in erster Linie beteiligt ist.

In diesen Fällen latenter Paratyphusinfektionen der Schlachttiere, die durch die makroskopische Untersuchung bei der Fleischbeschau nicht erfaßbar sind, führt die Verarbeitung des Fleisches zu Hackfleisch, Roh- und Eingeweidewürsten sowie zu Pökel- und Räucherfleisch zu einer starken postmortalen Vermehrung der intravital in die Organe oder die Muskulatur von Schlachttieren eingewanderten Paratyphusbakterien.

Der Genuß von Paratyphusbakterien enthaltenden Fleisches und Fleischwaren erweist sich roh, oder ungenügend sterilisiert aufgenommen, nicht selten als außergewöhnlich schädlich für den Menschen. Auf diese Weise entstehen *Massenparatyphuserkrankungen tierischen Ursprunges des Menschen*, die Fleischvergiftung endogenen Ursprunges im Sinne der alten Lehre.

Ausschlaggebend für die pathogene Wirkung intravital mit Paratyphusbakterien infizierten Schlachttierfleisches ist die *bipathogene Veranlagung dieser Typen* von Paratyphusbakterien, sofern das in der

Type selbst gelegene Virulenzvermögen durch besondere Umstände gesteigert worden ist und die Zahl der aufgenommenen Infektionserreger hinreichend ist, um die Wirkungsweise der Infektionserreger auf den befallenen Menschen bei gegebener Disposition in Erscheinung treten zu lassen.

Nach den bisherigen Beobachtungen von Übertragungen tierischer Paratyphusinfektionen durch Fleischgenuß auf den Menschen haben sich Gärtner-, Para-B- und Voldagsentypen mithin alle bei Schlachttieren und dem Menschen häufiger gefundene Typen von Paratyphusbakterien als *tier- und menschenpathogen* erwiesen. Eine prophylaktisch wirksame Erfassung aller akuten und insbesondere latenten Infektionen der Schlachttiere ist vom Standpunkte der Blutvergiftungslehre aus nicht möglich, da der septische Beschaubefund als Folgezustand der nichtspezifischen Wundinfektionen überhaupt *kein* Pathognosticum für Paratyphusinfektionen bildet und irreleitend wirkt.

Die Paratyphusinfektionen der Schlachttiere sind nur auf dem Wege der *bakteriologischen Fleischuntersuchung* als solche ermittelbar.

Im Hinblick auf die Latenz und schwere Erkennbarkeit gegebener Paratyphusinfektionen bei Schlachttieren sind die auf den Menschen übertragbaren Paratyphusinfektionen der Schlachttiere durch die Fleischbeschau jedoch schwer erfaßbar.

Die bakteriologische Fleischuntersuchung kann demzufolge bei der Ermittelung von Paratyphusinfektionen der Schlachttiere wohl wertvolle Dienste leisten, jedoch könnte auch die Untersuchung aller Schlachttiere — ihre Ausführbarkeit vorausgesetzt — keine völlige Gewähr für das Nichtübersehen lokaler Paratyphusinfektionen im *lymphatischen* und *myeloischen* System der Schlachttiere gewähren.

Soweit die bakteriologische Fleischuntersuchung der Ermittelung von Paratyphusinfektionen dient, ist sie dergestalt der Fleischbeschau dienstbar zu machen, daß der Fleischbeschausachverständige die Notwendigkeit der Anwendung der bakteriologischen Untersuchung bei der Begutachtung verdächtig erscheinender Tiere vom Standpunkte der Infektionslehre aus zu ermessen hat.

Die Anwendung der bakteriologischen Fleischuntersuchung zur weitmöglichsten prophylaktischen Verhinderung der Übertragung des zooparasitären Paratyphus auf den Menschen erfordert die *Aufnahme des Paratyphus der Schlachttiere als eine vom Tier auf den Menschen übertragbare Infektionskrankheit in die Ausführungsbestimmungen des Fleischbeschaugesetzes, losgelöst von der eitrig-jauchigen Blutvergiftung der Schlachttiere.*

Literaturverzeichnis.

Ballard, zit. nach *Durham*, Brit. med. journ. 1898, S. 1798. — *Bardachzi, F.*, und *Z. Barabas*, Über Massenerkrankungen an kurz verlaufendem typhoiden Paratyphus B. Med. Klinik 1917, S. 832. — *Bernhardt, G.*, Beitrag zur Frage der

Fleischvergiftungserreger; Paratyphus-B-Bacillen vom Typus Voldagsen als Erreger menschlicher Fleischvergiftungen. Zeitschr. f. Hyg. **73**, 65. 1912. — *Brovers, C. W.*, en *H. Offerhaus*, Vleeschvergiftiging. Nederlandsch tijdschr. v. geneesk. 1912, S. 682. — *Bollinger, O.*, Über Fleischvergiftung, intestinale Sepsis und Abdominaltyphus. Vorträge in den Sitzungen des ärztlichen Vereins zu München 1880. — *Conradi*, Zur Pathogenese der Fleischvergiftungen. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **20**, 105. 1909. — *Damman* und *Stedefeder*, Untersuchungen über Schweinepest. Arch. f. Tierheilkunde **36**, 432. 1910. — *Demnitz, A.*, Zur Frage der Menschenpathogenität des Bact. suipestifer. Dtsch. tierärztl. Wochenschr. **34**, 345. 1926. — *Erben, F.*, Über eine Gruppenerkrankung durch den Genuß der Eingeweide pestkranker Schweine. Münch. med. Wochenschr. 1911, S. 299. — *van Ermengem*, Die pathogenen Bakterien der Fleischvergiftungen. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann, Jena 1903.— *Friddrichs* und *Gardiewsky*, Massenerkrankung an Fleischvergiftung durch Bacillus enteritidis Gärtner im Standort Metz (April 1909). Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., 1909, S. 509. — *Fromme, A.*, Über eine Fleischvergiftung durch Paratyphusbacillen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **43**, 775. 1907. — *Geissler, W.*, Massenerkrankungen an Brechdurchfall und ihre Beziehungen zur Schweinepest. Zeitschr. f. Medizinalbeamte u. Krankenhausärzte **26**, 764. 1913. — *Glage, F.*, Über Fleischvergiftungen. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1913, S. 612. — *Glässer*, Die Krankheiten des Schweines. Hannover 1912, 2. Aufl. 1922. — *Günther*, Beitrag zur Lehre von den Fleischvergiftungen. Arch. f. Hyg. **28**, H. 2. — *Heimann, W.*, Über die durch einen sog. „Paratyphus C“-Bacillus verursachte Fleischvergiftungsepidemie in Hildesheim im Frühjahre 1911. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **66**, 211. — *Heller*, Bakteriologische Befunde bei einer Fleischvergiftungsepidemie. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **43**, 146. 1907. — *Herman*, L'intoxication carnée de Sirault. Archives de médicine expérimentale et d'anatomie pathologique **11**, 445. 1899. — *Hübener, E.*, Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen. Jena 1910. — *Hutyra* und *Marek*, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere; Kapitel Paratyphus. Jena 1922. — *Ilgner, W.*, Die Fleischvergiftungen im Mai 1912 in den Landkreisen Marienburg und Elbing. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **23**, 361. 1913. — *Kaunitz* und *Trawinsky*, Über den Befund von Bacillus suipestifer im Blute eines kranken Menschen. Wien. klin. Wochenschr. 1917, S. 1098. — *Karsten* und *Ehrlich*, Über bakteriologische Fleischbeschau und einige Fälle von Fleischvergiftungen. Tierärztl. Rundschau **30**, 15. 1924. — *König, H.*, Zur Frage der Fleischvergiftung durch den Bacillus paratyphi B. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **50**, 129. 1909. — *Kuppelmayr*, Zur Kasuistik der Fleischvergiftungen. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **34**, H. 16—18. 1924. — *Lentz, O.*, Über Fleischvergiftungen. Zeitschr. f. Hyg. **103**, 321. 1924. — *Manninger, R.*, Über den akuten Paratyphus der Ferkel. Dtsch. tierärztl. Wochenschr. **33**, 844. 1925. — *Materna, A.*, und *E. Januschke*, Ein Beitrag zu der Frage der ätiologischen Beziehungen zwischen der bacillären Schweinepest und dem Paratyphus B des Menschen. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **35**, 298. 1925. — *Mayer, G.*, Über Typhus, Paratyphus und deren Bekämpfung. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **53**, 234. 1910. — *Müller, L.*, Die Wurstvergiftung in Middelburg. Dtsch. Zeitschrift für prakt. Medizin **1875**, Nr. 1, 2, 3. — *Müller, M.*, Über den Zusammenhang des Paratyphus der Tiere mit dem Paratyphus des Menschen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. **80**, H. 7. 1918 u. **81**, H. 7. 1918. — *Müller, M.*, Paratyphus beim Pferde als Ursache von Massenerkrankungen beim Menschen nebst Bemerkungen über die Schuldfrage des Tier-

arztes bei Massenerkrankungen nach dem Genuß von als tauglich begutachtetem Fleische. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **31**, 239. 1921. — *Müller, M.*, Die Paratyphusbakterien in Ursache und Wirkung. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **32**, 71. 1921. — *Müller, M.*, Typhoide und Septicämie; Paratyphus und nichtspezifische Infektion. Münch. tierärztl. Wochenschr. **76**, Nr. 10—12. 1925. — *Müller, M.*, Der Paratyphus der Schlachttiere und seine Bedeutung für den Menschen im Lichte der ersten Auseinandersetzungen zwischen Blutvergiftungslehre und Infektionslehre. Dtsch. tierärztl. Wochenschr. **33**, Nr. 18. 1925. — *Müller, M.*, Gibt es auf den Menschen übertragbare Paratyphusinfektionen bei den Schlachttieren, die durch eine Infektion des Fleisches inter vitam et mortem entstehen? Tierärztl. Rundschau **32**, 1. 1926. — *Müller, M.*, Die Einführung der mikroskopischen und bakteriologischen Fleischuntersuchung als Auftakt eines neuen Zeitabschnittes der Fleischbeschau. Münch. tierärztl. Wochenschr. **76**, Nr. 26—29. 1925. — *Müller, M.*, Besteht ein Zusammenhang zwischen der Blutvergiftung der Schlachttiere und der Fleischvergiftung des Menschen. Zeitschr. f. Hyg. **105**, 524. 1925. — *Müller, M.*, Ein lehrreicher auf der Grundlage der Blutvergiftungslehre nicht klärbarer Fall von „Fleischvergiftung". Latente intravitale Paratyphusinfektion von Schweinefleisch mit Schädlichkeit für den Menschen. Tierärztl. Rundschau **32**, Nr. 12. 1926. — *Neukirch, P.*, Über Paratyphusbakterien im Blute bei ruhrähnlichen Erkrankungen in der Türkei. Berl. klin. Wochenschr. 1917, S. 360. — *Neukirch, P.*, Über menschliche Erkrankungen durch Bacillen der Glässer-Voldagsen-Gruppe in der Türkei. Zeitschr. f. Hyg. **85**, 103. 1918. — *Neustadt* und *Steiner*, Über gehäuft auftretende Colibacillosen mit paratyphusähnlichem Krankheitsverlaufe. Wien. klin. Wochenschr. 1918, S. 415. — *Ostertag, R.*, Was bedeutet der Befund eines Bakteriums mit den Eigenschaften des Bacillus paratyphosus B im Fleische? Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **19**, 102. 1908. — *v. Ostertag, R.*, Handbuch der Fleischbeschau, Bd. II. 1923. — *Pfeiler, W.*, und *F. Engelhardt*, Die Fleischvergiftung in Bobrau im Juli 1913 nebst Bemerkungen über die Feststellung von fleischvergiftenden Bakterien und ihre Bezeichnung. Mitteilungen des Kaiser Wilhelm-Instituts f. Landwirtschaft **6**, 244. 1914. — *Pfeiler, W.*, Bemerkungen zu Fleischbeschaufragen bei Ferkeltyphus. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **34**, 225. 1924. — *Potevin*, Contribution à la bactériologie des gastro-entérites infectieuses. Ann. de l'inst. Pasteur 1905, T. 19. S. 426. — *Pouchet, G.*, Bactériologie appliquée à la médicine légale. Annales d'hygiène publique T. 37, S. 209. — *Prigge* und *Sachs-Mücke*, Paratyphusausscheidung bei Kranken und Gesunden. Klin. Jahrbuch **22**, 237. 1910. — *Prigge-Sachs-Mücke*, Beobachtungen bei zwei durch Nahrungsmittel verursachten Paratyphusepidemien. Klin. Jahrbuch **21**, 225. 1909. — *Riemer*, Über eine nach Genuß von Leberwurst beobachtete Fleischvergiftung und deren Erreger. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **48**, 169. 1908. — *Rimpau, W.*, Jahresbericht der Kgl. bakteriologischen Untersuchungsanstalt München für das Jahr 1912. Arch. f. Hyg. **80**, 10. 1913. Anhang. — *Rocchi*, Beitrag zum Studium der Serodiagnose bei den infektiösen, durch Nahrungsmittel verursachten Gastroenteritiden. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **43**, 202. 1907. — *Rommeler, G.*, Zur Theorie und Praxis der bakteriologischen Fleischbeschau. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **20**, 115. 1910. — *Salmon* and *Smith*, The bacterium of swineplague. The American monthly microscop. Journ. 1886. — *Savage* and *Gunson*, An outbreak of poisoning from infected brawn. Journ. of hyg. **8**. 601. 1908. — *Shibayama*, Über die Pathogenität des Mäusetyphusbacillus für Menschen. Münch. med. Wochenschr. 1907, S. 979. — *Silberschmidt*, Über eine Fleischvergiftung. Korrespondenzbl. f. Schweiz. Ärzte **26**, Nr. 8. 1896. — *Standfuss, R.*, Bakteriologische

Fleischbeschau. Berlin 1922. — *Standfuss, R.*, Jahresberichte des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes zu Potsdam über die bakteriologische Fleischbeschau in den Jahren 1922, 1923, 1924. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **34** u. **35**. — *Tiberti, N.*, Bakteriologische Untersuchungen über eine Fleischvergiftungsepidemie. Zeitschr. f. Hyg. **60**, 41. 1908. — *Uhlenhuth, P.*, Bericht über die 11. Versammlung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie in Frankfurt a. M. vom 24.—26. IX. 1925. Paratyphus. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., **97**, 219. 1926 und Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **36**, 26. 1925. — *Uhlenhuth* und *W. Seiffert*, Der gegenwärtige Stand des Paratyphusproblemes. Dtsch. med. Wochenschr. **52**, Nr. 16, 17, 18. 1926. — *Uhlenhuth, Hübener, Hylander* und *Bohtz*, Untersuchungen über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest. Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt **27**, 225. 1908. — *Uhlenhuth, P.*, und *E. Hübener*, Über die Verbreitung der Paratyphus B- und Gärtnergruppe und ihre Beziehungen zur gastrointestinalen Form der Fleischvergiftungen. Med. Klinik 1908, Nr. 48, S. 1823. — *Warnecke, H.*, Ein Fall von Fleischvergiftung. Tijdschr. v. Veeartsenijkunde **41**, 359. 1914; Referat in Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **24**, 559. 1914. — *Weil*, Paratyphus B-ähnliche Krankheitserreger (Typus Suipestifer Voldagsen) in Albanien. Wien. klin. Wochenschr. 1917, S. 1061. — *Weil* und *Saxl*, Über eine Infektionskrankheit, bedingt durch einen Keim aus der Paratyphusgruppe. Wien. klin. Wochenschr. 1917, S. 519. — *Zeller*, Differenzierungsversuche in der Paratyphus-Gärtnergruppe. Zeitschr. f. Infektionskrankh., parasitäre Krankh. u. Hyg. d. Haustiere **23**, 190 und **24**, 1. — *Zschokke*, Über die Gefährlichkeit des Genusses von mit Schweineseuche infiziertem Fleische. Schweizer Archiv für Tierheilkunde **39**, 168. 1897.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Münster i. W.
Direktor: Prof. *K. W. Jötten.*)

Über den Einfluß des Bacterium coli auf pathogene Darmkeime.

Von
Dr. med. **Georg Josef Pfalz,**
Assistent am Institut.

Mit 7 Textabbildungen.

Wer die Eigenart eines Mikroorganismus von Grund aus und umfassend erforschen will, um ihn als einen Sonderling aus der Menge ihm oberflächlich ähnelnder, rassenverwandter Formen herauszuheben, muß möglichst viele seiner Lebensäußerungen und Lebensbedingungen zu erkennen suchen und aus der Fülle der Erscheinungen die ihn allein kennzeichnenden Merkmale ermitteln.

Als wir uns die Aufgabe stellten, eine Abgrenzung von Untergruppen innerhalb der nach Form und Wirkungsweise so weit verzweigten Gattung des Bacterium coli zu treffen, um dadurch praktisch verwendbare Richtlinien für die Prognose und Behandlung verschiedenster akuter Erkrankungen der Verdauungs- und Harnwege zu schaffen, führte uns der eben entworfene Gedankengang zur Verwertung der durch die Arbeiten von *Roos*[1, 2]), *Bienstock*[3]), *Nissle*[4–8]), *Prell*[9]) und *Langer*[10]) gegebenen Anregungen.

In der durch entsprechende Untersuchungen gewonnenen Annahme, daß jeder Organismus nur über *einen* entscheidend wirksamen Colistamm verfüge, der ihm lebenslänglich und lebenswichtig zugehört und dadurch also zu einem wesentlichen Konstitutionsfaktor für ihn wird, übertrug *Roos*[1, 2]) den Individualstamm eines Patienten mit normaler Verdauungstätigkeit per os auf einen zu akuten Infektionen neigenden Darm in der Absicht, eine Überwucherung der pathogenen Keime durch das eingeführte, biologisch vollwertige Colibakterium und damit eine Dauerheilung zu erzielen. *Bienstock*[3]) beobachtete eine Wachstumshemmung der anaeroben Erreger der Fäulnis und putriden Infektionen durch die normale Darmflora der Bacteria coli und lactis aerogenes. Die Erfahrungen beider Autoren verarbeitete *Nissle*[4–8]) zu einem Verfahren zahlenmäßiger Ermittelung der Verdrängungskraft von Colibakterien im Kampfe mit einem bestimmten Typhusstamm.

Er züchtete aus dem Darminhalte eines anamnestisch selbst bei Daueraufenthalt inmitten hochinfektiöser Umgebung niemals darmerkrankten Patienten einen außerordentlich stark überwucherungsfähigen Colistamm, der heute als Mutaflor im Handel ist. Er soll imstande sein, durch Verdrängung nicht nur pathogener Keime, sondern auch biologisch schwach wirksamer Coliindividualstämme Bacillenträger unschädlich zu machen, chronisch rezidivierende Fälle von Ruhr und Typhus zu heilen und die verschiedensten entzündlichen Störungen der Verdauungs-, Harn- und Gallenwege zu beheben.

Läßt man in einer Mischkultur in Nährbouillon Colibakterien und Typhus- oder Ruhrbacillen in gleichem Mengenverhältnis genügend lange aufeinander einwirken und stellt dann nach geeigneter Verdünnung Ausstrichkulturen auf Kontrastnährböden, beispielsweise Endoagarplatten, her, so bestimmt sich der „antagonistische Index" *Nissles* aus der Anzahl der auf 100 Colikolonien entfallenden Typhus- oder Ruhrkolonien. Die Ergebnisse *Nissles*, die von *Prell*[9]) und *Langer*[10]) ursächlich besonders nach biochemischen Gesichtspunkten ohne eine eindeutige Klärung der komplizierten Vorgänge geprüft wurden, berechtigten uns zu dem Schlusse, in der Feststellung der mehr oder minder stark verdrängenden Wirkung eines Colistammes ein Gruppenkennzeichen zu erblicken, das geeignet wäre, unsere biologischen und serologischen Befunde zu stützen. Wir isolierten zu diesem Zwecke aus dem Stuhlmaterial von Patienten verschiedensten Lebensalters und Krankheitsbefundes eine erste Beobachtungsreihe von 17 Colistämmen. Wir fanden dabei die obenerwähnte Tatsache des Vorhandenseins nur *einer* entscheidend wirksamen Individualgruppe bei jedem Patienten bestätigt; denn bei wiederholter Stuhluntersuchung derselben Person und Prüfung mehrerer dem bloßen Auge durch Größe und Gestalt ihrer Kolonien, sowie durch die Stärke ihres Fuchsinglanzes verschiedenartig erscheinender Formen ergaben Agglutination, Komplementbindung und Rezeptorenanalyse übereinstimmend Gruppeneinheit, abgesehen von einem Falle, wo sich unter 9 formverschiedenen Colikeimen *ein völlig abweichender Stamm* zeigte.

Von jedem Stamme legten wir je 9 Bouillonkulturen gleicher Dichte an und mischten sie nach 18 Stunden Brutschrankaufenthalts und Filtration je mit 9 gleich alten und dichten Typhus- und Paratyphus-Bouillonkulturen in gleichem Mengenverhältnis. Die Mischkulturen blieben zur Auswirkung des gegenseitigen Verdrängungskampfes 18 Stunden im Brutschrank; nach abermaliger Filtration und zweckmäßiger Verdünnung wurden gleiche Kulturmengen auf Endoplatten ausgespatelt und nach Auskeimen der beiden Arten von Kolonien das Kräfteverhältnis durch Auszählen der auf 100 Colikolonien entfallenden pathogenen Keime festgelegt. Es boten sich dabei regelmäßig Verhält-

nisse, wie sie die Abb. 1—3 zeigen: ein mehrminder starkes, meist dem bloßen Auge erkennbares Überwiegen der glashellen, pathogenen Keime über die roten Colikolonien oder umgekehrt. Als Normalmaß für sämtliche überimpften Kulturmengen nahmen wir nach den Angaben *Nissles* eine eigens diesen Versuchen vorbehaltene Normalöse an und arbeiteten grundsätzlich nur mit dieser. Technische Schwierigkeiten bietet im Anfang die Ermittelung eines geeigneten Verdünnungsgrades des Ausstrichmaterials, der ein Zusammenfließen der Einzelkolonien und damit die Unmöglichkeit ihrer Zählung ausschließt, ohne indessen infolge zu spärlichen Auswachsens ein lücken- und fehlerhaftes Bild des Kräfteverhältnisses zu erzeugen.

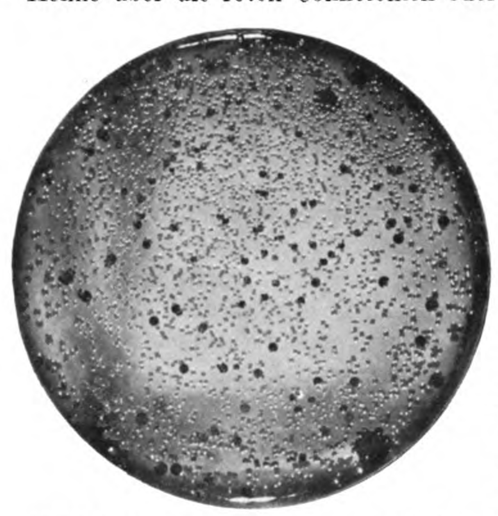


Abb. 1. Überwucherndes Wachstum von Paratyphusbacillen in Mischkultur mit Colibakterien.

Um das an sich raschere und üppigere Entwicklungsvermögen der Colibacillen, soweit dieses nur durch ihre geringeren Wachstumsbedingungen begründet ist, als Fehlerquelle zu beseitigen, legten wir Versuchsreihen verschieden widerstandsfähiger Typhus- und Paratyphusbouillonkulturen an, die zu einem Drittel frisch gewonnenem Material entstammten und impften gleichzeitig sowie nach 2, 4, 6, 10 und 24 Stunden Colibakterien nach; wir fanden ein Optimum gegenseitiger Wachstumsbeeinträchtigung im Sinne anschaulicher Darstellung und objektiver Beurteilung ihres biochemischen Kräfteausgleiches bei 6 Stunden und ließen daher fortan dem pathogenen Keim in der Mischkultur einen entsprechenden Wachstumsvorsprung.

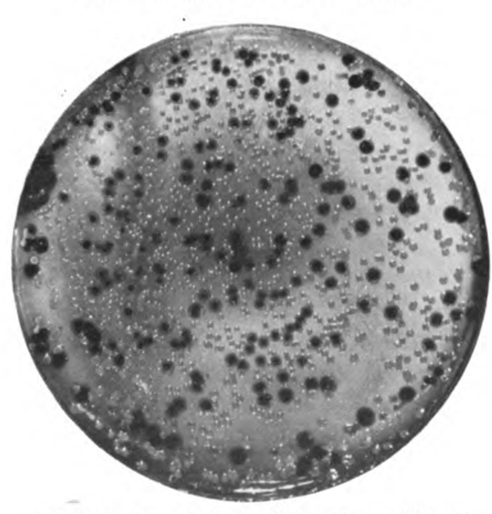


Abb. 2. Annähernd gleiches Entwicklungsbild beider Keimarten in Mischkultur.

Im Verlauf der Untersuchungen gewannen wir den Eindruck, daß bei der Bekämpfung pathogener Darmkeime durch apathogene die Widerstandskraft des Infektionserregers außer dem antagonistischen Coliindex eine weit wichtigere Komponente ist als dies bisher anerkannt wurde, und daß ihr in vielen Fällen entscheidende Bedeutung zukommt. Wenn ein Typhus- und ein Paratyphusbacillus, beispielsweise B. typh. 288 und B. paratyph. B_6 der Abb. 4a von 17 Colistämmen mit 2 Aus-

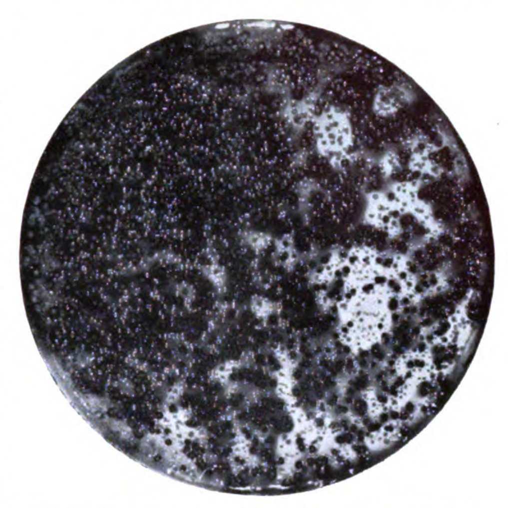


Abb. 3. Vorwiegendes Coliwachstum in Mischkultur mit Typhusbacillen.

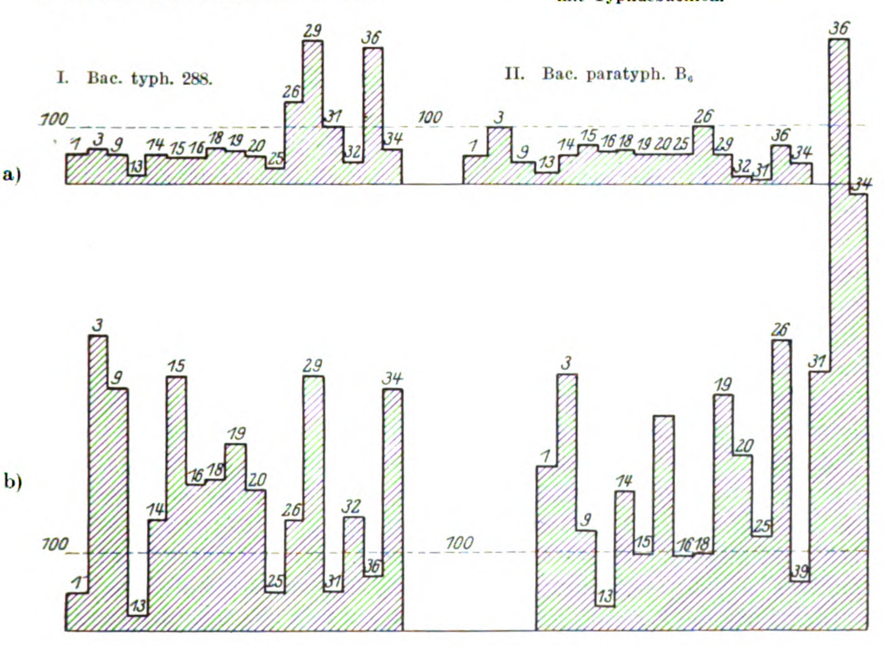


Abb. 4. Graphische Darstellung des *Unterschiedes* der *Kolonienzahlen* bei a) *schwach widerstandsfähigen* (I, II), b) *stark widerstandsfähigen* (III, IV) Typhus- bzw. Paratyphusstämmen, übereinstimmend ermittelt in Mischkulturen mit sämtlichen 17 Colistämmen (Nr. 1—34).
Jede schraffierte Säule stellt graphisch die Kolonienzahl des unter ihr bezeichneten Typhus- bzw. Paratyphusstammes in Mischkultur mit dem über ihr numerierten Colistamm dar; die mit 100 bezeichnete wagrechte Linie stellt den zu jeder schraffierten Säule gehörigen Vergleichswert von 100 Colikolonien dar.

nahmen durchweg um etwa 70 Prozent Wachstumsenergie übertroffen werden, zwei andere Stämme dagegen, z. B. B. paratyph. B *Mua* und A *Bürgers* (Abb. 4b), die gleiche Colireihe fast ebenso übereinstimmend um ein Vielfaches an Überwucherungsvermögen überflügeln, ist die Annahme berechtigt, daß den Ausgang des Bakterienkampfes in der Regel und in erster Linie die mehr oder minder hohe biochemische Widerstandskraft des pathogenen Keimes bestimmte. Wir weisen indessen darauf hin, daß uns auch Ausnahmeerscheinungen von dieser Regel insofern begegnet sind, als 2 stark überwucherungsfähige Colistämme (Stamm 13 und 31 auf Abb. 4) diese Fähigkeit auch gegenüber den widerstandskräftigsten Paratyphusbacillen behaupteten.

Das paarweise verschiedene Verhalten der beiden mehr und minder resistenten Typhus- bzw. Paratyphusbacillen gegenüber der Gesamtzahl unserer Colistämme bewies die entscheidende Bedeutung des pathogenen Keimes im Verdrängungsversuch; trifft diese Annahme zu, so muß sich umgekehrt übereinstimmendes Verhalten verschiedenster, willkürlich ausgewählter Colistämme gegenüber der Gesamtzahl der vorhandenen Typhus- und Paratyphusstämme ergeben. Daß dies der Fall ist, beweisen die nach Form und Aufbau übereinstimmenden Kurven der Abb. 5, wobei ich auf die bei sämtlichen Colistämmen wiederkehrenden Anstiege bei V und VI, die den resistenten Paratyphen B *Mua* und A *Bürgers* entsprechen, und auf die tiefen Abfälle bei II und VII, die die Labilität der Stämme B. typh. 288 und paratyph B_6 kennzeichnen, hinweisen möchte.

Aus den Ergebnissen der ersten Beobachtungsreihe ergibt sich ein auffällig höherer durchschnittlicher Resistenzwert der Paratyphusgruppe im Vergleich zu den Typhusbacillen gegenüber der Coliwirkung. Da wir wiederholt aus dem Urin Pyelitiskranker entartete Colistämme und aus Stuhlmaterial Paracolibakterien von höchstem Überwucherungsvermögen züchteten, denen gegenüber stärkste Antagonisten versagten, liegt der Gedanke nahe, daß die Paratyphuserreger ebenso wie die erwähnten Keimarten infolge ihrer relativ nahen Verwandtschaft zur Colirasse von deren Stoffwechsel- und Fermentwirkungen unbehelligt bleiben im Gegensatz zu den auch in anderer Beziehung verwandtschaftlich abseits stehenden Typhusbacillen. Die biochemischen Untersuchungen von *Sartorius* am hiesigen Institut, der in zahlreichen Versuchsreihen die verschiedensten Farbstoffe wachstumshemmend auf die Vertreter der Typhus-, Ruhr-, Coligruppe einwirken ließ und dabei ebenfalls höchste Widerstandsfähigkeit der Paratyphusbacillen feststellte, legen andererseits den Gedanken nahe, daß sie gegen chemische Wirkungen im allgemeinen stärker geschützt sind als Typhuserreger.

Ein etwaiger Einwand, die zur Untersuchung gelangten Typhusstämme hätten im Gegensatz zu den Paratyphen durch Alter und viel-

fache Umzüchtung ihre Widerstandskraft verloren, wäre nicht stichhaltig; denn ein frisch gewonnener Typhusstamm, der aus den Organen eines unter allerschwersten, klinischen und anatomischen Erscheinungen erlegenen Patienten gezüchtet wurde, zeigte kaum ein Viertel der Coliresistenz des fast ein Jahrzehnt allmonatlich umgezüchteten Paratyphusstammes *Bürgers*.

Die rassenbiologische Eigenart eines Bakteriums, nicht die Organschädlichkeit im klinischen Sinne bestimmt also seine Coliresistenz,

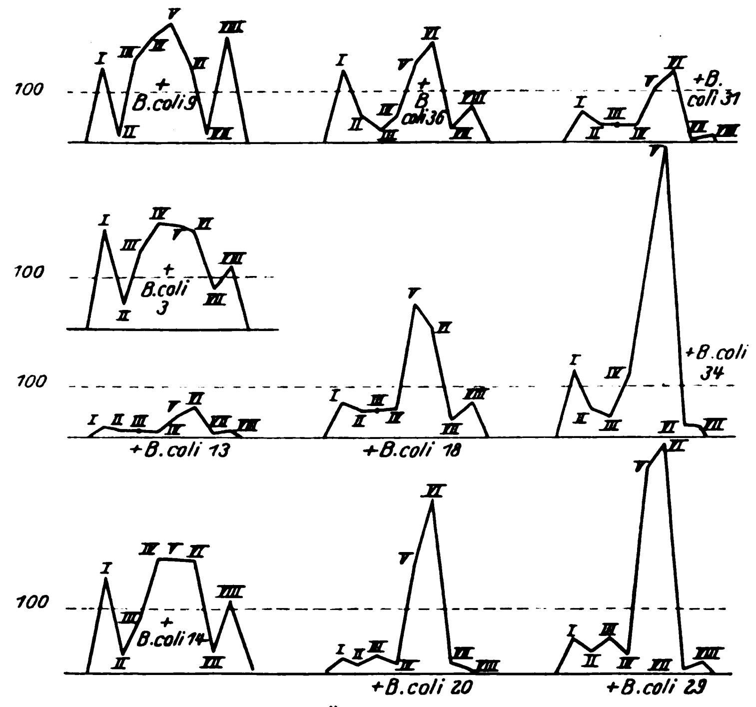


Abb. 5. Graphische Darstellung relativer *Übereinstimmung* der Kolonienzahlen *sämtlicher Typhus- bzw. Paratyphusstämme* in Mischkulturen mit *einzelnen* Colistämmen.
Die Zahlen I—VIII bezeichnen die Typhus- bzw. Paratyphusstämme in Mischkulturen mit den mit + versehenen Colistämmen; sie stehen über den 8 Scheitelpunkten jeder Kurve, welche die Kolonienzahlen der pathogenen Keime graphisch darstellen. Die mit 100 bezeichnete Linie entspricht, zu jedem Scheitelpunkt zugehörig, dem Vergleichswert von 100 Colikolonien.

und diese wiederum scheint von seiner mehr oder minder nahen Verwandtschaft zur Coligattung abhängig zu sein. Wichtig in diesem Zusammenhange war uns die Tatsache, daß in analoger Weise die Pararuhrbacillen (Bac. pseudo-dys. A, D, H der *Kruse*schen Einteilung) Colibakterien gegenüber durchschnittlich weit resistenter waren als die echten Kruse-Shiga-Ruhrbacillen. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der von *Sartorius* vorgenommenen Wachstumsbeeinträchtigung pathogener Keime durch Farbstoffe.

Anschließend an diese Ergebnisse habe ich die Beobachtung mitzuteilen, daß ein Colistamm auch bei pathogener Entartung keine Änderung seiner verdrängenden Wirkung zu erfahren scheint; denn ein aus dem Stuhl eines akut ernährungsgestörten Säuglings gewonnenes Colibakterium zeigte auf der Höhe des Intoxikationsstadiums den gleichen Verdrängungsindex wie mehrere Wochen nach Abklingen sämtlicher akuter Erscheinungen, nachdem es erneut aus dem Stuhl isoliert und die Identität beider Stämme morphologisch und serologisch erwiesen war.

Hatte das Verhalten der ersten Colireihe bei der Bekämpfung fremden Typhus- und Paratyphusmaterials die Bedeutung des Resistenzwertes pathogener Keime Colibakterien gegenüber gezeigt, so bot gerade diese Erkenntnis wertvolle ursächliche und prognostische Ausblicke für das Zustandekommen und den Verlauf akuter Darminfektionen im allgemeinen.

Unter diesem Gesichtspunkte ließen wir 15 aus Stuhlausstrichplatten Ruhrkranker frischgewonnene und serologisch eingestufte Pararuhrstämme (9 Pseudodys. A, 3 Pseudodys. D, 3 Pseudodys. H der Kruseschen Einteilung) je mit dem entsprechenden, denselben Stuhlausstrichen entnommenen Colibacterium in oben angegebener Weise reagieren und stellten auf Endoplatten das Kräfteverhältnis beider Gattungen fest. Um fehlerhafte Einflüsse auf die Wertmessungen auszuschalten, ließen wir jeden der 15 Colistämme außerdem auf den widerstandsschwächsten und -stärksten Pararuhrstamm der Laboratoriumssammlung einwirken und erhielten so für den Versuchsstamm zuverlässige und ausreichende Werte. Bei Abschluß der 2. Versuchsreihe zeigte sich einerseits die Bestätigung der von *Nissle* gemachten Erfahrung, daß die bei akuten Darminfektionen gewonnenen Colistämme allgemein zu den leistungsschwachen gehören, andererseits aber die bedeutsame Tatsache, daß im Versuchsröhrchen einzig diejenigen pathogenen Versuchsstämme die Coliinvasion abwehren konnten, die auch im Darmtraktus der betreffenden Patienten das schwerste Krankheitsbild verursacht hatten. Es sind dies die Stämme 5, 12 und 13 der Abb. 6, deren Wachstumsziffern sich durch Überschreiten der 100 Colikolonien entsprechenden Linie wesentlich von den übrigen 10 labilen Erregern klinisch abortiv oder normal verlaufener Ruhrerkrankungen unterscheiden. Während also das Überwucherungsvermögen der Colibakterien der zweiten Versuchsreihe, jedes Mal gemessen am Resistenzwert der pathogenen Kontrollstämme, durchweg gering war, ihre antagonistischen Indexziffern mithin keine praktisch verwertbaren Hinweise bezüglich des Krankheitscharakters boten, ließ die Bestimmung des Coliresistenzwertes pathogener Versuchsstämme in jedem Falle zuverlässige prognostische Schlüsse zu, sie können damit als Gradmesser für die Virulenz pathogener Darmkeime angesehen werden.

Bei Betrachtung der Eigenart dieses Machtkampfes pathogener und apathogener Darmkeime drängt sich naturgemäß die Frage nach Ursachen und Kraftquellen derartiger Verdrängungserscheinungen auf. Versuche zur Ermittelung hypothetischer, den Antagonisten schädigender Abwehrstoffe überwucherungsfähiger Keime führten ebenso wie die einschlägigen Arbeiten von *Nissle*, *Prell* und *Langer* zu keinem Ziele; wir sterilisierten durch mehrfaches Filtrieren mittels Berkefeldkerzen einwandfrei Colibouillonkulturen je zweier schwach und stark verdrängender Colistämme und impften nachträglich Typhusbacillen hinein, ohne den Wachstumsunterschieden im entsprechenden Ver-

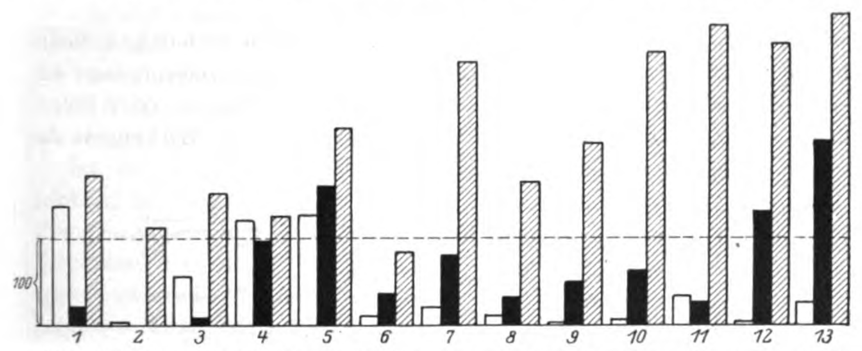


Abb. 6. Graphische Darstellung der Kolonienzahlen von Pararuhrbacillen in Mischkultur je mit dem aus gleichem Material gewonnenen Colibacterium.

Schwarze Säulen kennzeichnen die Kolonienzahlen der Pararuhrstämme 1—13.
Weißumrandete „ „ „ „ des widerstandsschwächsten Kontrollst.
Schraffierte „ „ „ „ „ widerstandskräftigsten Kontrollst.

Die mit 100 bezeichnete Linie stellt den jeder Säule zugehörigen Vergleichswert von je 100 Colikolonien des jedem Pararuhrstamme entsprechenden, d. h. aus dem gleichen Stuhlmaterial gezüchteten Colistammes dar.

drängungsversuche auch nur annähernd vergleichbare Abweichungen zu erhalten.

Der Annahme, das Überwiegen der einen Bakterienart über die andere lediglich mit deren unterschiedlicher Entwicklungsschnelligkeit zu begründen, widersprechen unsere Beobachtungen bei gestaffelten Verdrängungsversuchen, wobei wir einer Anzahl Bouillonkulturen stark und schwach verdrängender pathogener Keime gleichzeitig sowie nach 2, 6, 10 und 24 Stunden Colistämme beifügten. Dabei verhielten sich im Aufholen des verschieden großen Wachstumsvorsprunges der pathogenen Keime stark und schwach verdrängende Colistämme in keinem Falle so unterschiedlich, daß die oben gezeigten erheblichen Wachstumsunterschiede allgemein mit verschiedener Entwicklungsgeschwindigkeit erklärt werden könnten.

Da uns bei den leistungsschwächsten Colistämmen, z. B. Stamm 29, im Gegensatz zur Gesamtzahl der übrigen das Unvermögen der Milch-

gerinnung auffiel, stellten wir in milchzuckerhaltigen Bouillonkulturen gleicher Menge und Dichte den Säuregehalt von 20 Colistämmen nach 4, 8, 16, 24, 48 und 96 Stunden fest. Wie die Kurven auf Abb. 7 zeigen, boten nur die ersten 3 Messungen brauchbare, gleichmäßig ansteigende Werte, während späterhin wohl infolge des Auftretens basischer Nährboden- und Bakterienabbauprodukte, die einen Teil der Säure banden, unregelmäßige Schwankungen und Absinken der Säurewerte auftraten. Auffällig sind hierbei der verhältnismäßig niedrige Säuregrad der leistungsschwachen Stämme B. coli 29 und 34 und der hohe Säuretiter der starkverdrängenden Stämme B. coli 3′ und 31. Auf Grund dieser Beobachtungen möchten wir das fermentative Säurebildungsvermögen bestimmter Bakteriengruppen vorwiegend auf milchzuckerhaltigen Nährböden nicht als auslösende Ursache der Überwucherungsvorgänge ansprechen; wohl aber kennzeichnet es als auffällige Begleit- oder Folgeerscheinung ursächlicher, noch unklarer biochemischer Wirkungen die

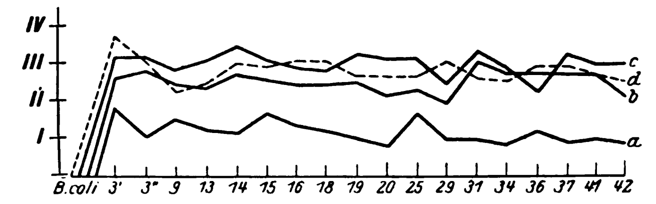


Abb. 7. **Vergleichende Darstellung des Säuregehaltes in Milchzucker-Bouillonkulturen von Colistämmen, die aus normalen und pathologischen Exkreten verschiedenster Ätiologie gewonnen wurden.**

a = 4 Stunden
b = 8 „
c = 16 „
d = 24 „ } nach Anlage der Kulturen.

Die einzelnen Bildpunkte der Kurven bestimmen sich durch die unter ihnen stehenden Zahlen 3′ bis 42, welche die Colistämme bezeichnen, sowie durch die Zahlen I—IV, die die Kubikzentimeter der zur Säuretitration verbrauchten n/10 Natronlauge angeben.

überwucherungsfähigen Stämme im Gegensatz zu den leistungsschwachen in ähnlicher Weise, wie deren Spontanagglutination mit tierischen und menschlichen Normalseren, auf die noch besonders zurückzukommen ist.

Beide starkverdrängenden Keimen eigentümlichen Fähigkeiten könnten wegen der Regelmäßigkeit ihres Nachweises als beachtliche Wesenszüge wegweisend für die Erforschung ihres vielseitigen biologischen Charakterbildes werden.

Nach diesen Erfahrungen suchen wir die Ursache höherer oder niederer Entwicklungsfähigkeit eines Bakterienstammes oder einer Keimgattung beim Verdrängungskampfe auf biochemischem Gebiete. Wir möchten dabei, übereinstimmend mit *Loew*[11]), für das B. coli im Hinblick auf seinen Daseinszweck eine ihm in besonderem Maße eigene, an die lebende Bakteriensubstanz gebundene tryptische Fermenttätigkeit, sowie ein ebenfalls fermentativ bedingtes, gegenüber anderen

Gattungen besonders ausgeprägtes Aufbauvermögen arteigenen Zelleiweißes annehmen. Der antagonistische Coliindex würde sich danach durch die verschieden hohe Intensität beider Fähigkeiten bestimmen, während die Coliresistenz pathogener Darmkeime von deren Widerstandsfähigkeit dem tryptischen Coliferment gegenüber und ihrer Neigung zu autolytischem Zerfall abhängig ist. Mit dieser Annahme findet die verschieden hohe durchschnittliche Coliresistenz von Typhus- und Kruse-Shiga-Ruhrbacillen gegenüber Paratyphus- und Pararuhr- (Pseudoruhr-Kruse)bacillen eine biologisch begründete Erklärung.

Wie einleitend dargelegt, führten wir die Beobachtungen der Überwucherungsvorgänge pathogener und apathogener Darmkeime in der Absicht aus, unsere Kenntnis rassenbiologischer Merkmale innerhalb der verschiedenen Coligruppen zu deren Abgrenzung zu erweitern. Nach Abschluß dieser Untersuchungen bleibt somit die Frage zu beantworten:

Ist der antagonistische Index der Colibakterien ein Rassenkennzeichen, bzw. gehören die stark überwucherungsfähigen Stämme in streng immunbiologischem Sinne zu einer Gruppe? Auf Grund unserer Ergebnisse verneinen wir die Frage im Gegensatz zu *Nissle*, der für die agglutinatorische Verwandtschaft der starken Stämme eintritt, da er bei ihnen Mitagglutination untereinander bis zur vollen oder annähernd vollen Titergrenze im Gegensatz zu schwachen und mittelmäßigen Stämmen fand. Die der serologischen Gruppenforschung dienende Prüfung sämtlicher auf Abb. 4 und 5 aufgeführter Colistämme durch Agglutination, Komplementbindung und Rezeptorenanalyse erwies uns die verschiedene immunbiologische Gruppenzugehörigkeit der starkverdrängenden Stämme, dagegen aber die serologische Verwandtheit der leistungsschwachen und -starken Colibakterien.

Ebensowenig können wir den Befund mangelhafter Agglutininbildung im allgemeinen bei Tierimmunisierung mit leistungsschwachen Stämmen bestätigen; wir erreichten mit schwächsten Verdrängern beispielsweise mit Stamm 29 (vgl. Abb. 4 und 5) durch sechsmalige, wöchentlich ansteigende intravenöse Dosen von $^1/_{25}$ bis 2 Normalösen lebender Kultur Titerhöhen bis zu $^1/_{6400}$ und $^1/_{12\,800}$. Durch Prüfung von je 10 Menschen- und Kaninchennormalseren sowie je 2 Meerschweinchen- und Hammelnormalseren auf Spontanagglutination mit Colibakterien stellten wir indessen in Übereinstimmung mit *Nissle* die in sämtlichen Seren nachweisbare, spontane Agglutinierbarkeit des stark überwucherungsfähigen Stammes 13 bis durchschnittlich $^1/_{80}$ fest, während von den leistungsschwachen Keimen nur 15% Agglutination, und zwar durchschnittlich nur bis $^1/_{25}$ zeigten.

Die Beobachtung der Verdrängungsvorgänge in Mischkulturen normaler und infektiöser Darmkeime hat die von uns erwartete Erweiterung

unserer Kenntnis immunbiologischer Rassenunterschiede innerhalb der Gattung des B. coli nicht gebracht; immerhin bietet die Ermittelung höherer und niederer Coliresistenz der einzelnen Gruppen und Stämme der Pararuhr- (Pseudodysenterie-Kruse-) und Paratyphusbacillen wichtige praktische Ausblicke im Sinne einer prognostisch und prophylaktisch verwertbaren Virulenzbestimmung der infektiösen Darmbakterien.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Roos*, Münch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 43. — [2]) *Roos*, Med. Klinik **9**, Nr. 44. — [3]) *Bienstock*, Zentralbl. f. Bakteriol. **29**, 534. 1901. — [4]) *Nissle*, Dtsch. med. Wochenschr. 1916, Nr. 39. — [5]) *Nissle*, Med. Klinik 1918, Nr. 2. — [6]) *Nissle*, Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 25. — [7]) *Nissle*, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 31. — [8]) *Nissle*, Zentralbl. f. Bakteriol. **93**, 114. — [9]) *Prell*, Zeitschr. f. Hyg. **88**, 507. — [10]) *Langer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1917, Nr. 47. — [11]) *Loew*, Münch. med. Wochenschr. 1925.

(Aus dem Zentralen Laboratorium der Südwesteisenbahnen und dem Zentralen Sanitär-Hygienischen Laboratorium der Stadt Kiew.)

Die Härtebestimmung mittels der elektrischen Leitfähigkeit im Kiewer Leitungswasser.

Von

Dr. P. Bereschansky, Dr. M. Majewsky und Dr. L. Schustowa.

Im Januarheft 1925 der *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* hat *L. Fleischer*[1]) eine Arbeit über „*Die Verwendbarkeit der elektrischen Leitfähigkeit für die Trinkwasseruntersuchung, besonders für die Härtebestimmung*", veröffentlicht. Die vom Autor ausgearbeitete Methode ergab sehr günstige Resultate im Sinne einer sehr guten Übereinstimmung der dabei erhaltenen Härtegrade mit denen auf Grund der Gewichtsanalyse gewonnenen.

Außerdem erlaubt die Methode mit genügender Genauigkeit das Gewicht des wasserfreien Salzrückstandes zu bestimmen und die Frage zu lösen, ob ein Trinkwasser größere Mengen Erdalkalinitrate oder Erdalkalichloride enthält.

Bestimmungen des Leitfähigkeitwertes wurden schon längst in der Trinkwasseruntersuchung ausgeführt [*Weldert*[2]), *Karaffa-Korbut*[3]), *Doroschewsky* und *Dworschantschik*[4]), *Wassiliewa*[5])], aber die erhaltenen Werte wurden meistens bloß zur Feststellung des Abdampfrückstandes ausgenutzt und eine praktisch-brauchbare Methode der Härtebestimmung wurde dabei nicht ausgearbeitet.

Indessen bietet gerade die Härtebestimmung mittels der Leitfähigkeit große Vorteile in der praktischen Trinkwasseruntersuchung im Vergleich zur recht teuren und umständlichen Gewichtsanalyse. Darum schien es uns wünschenswert, die Methode von *Fleischer* an unserem Kiewschen Leitungswasser anzuwenden.

Wir möchten kurz daran erinnern, daß *Fleischer* für die Härteberechnung folgende Formel angibt*).

$$H^0 = \frac{L - 3\,Cl - 20 + K\,(F_s - F_k)}{F_s},$$

*) Über alle Einzelheiten müssen wir wegen Platzersparnis auf das Original verweisen.

worin H^0 die Härte des betreffenden Wassers in deutschen Härtegraden, L die Leitfähigkeit des betreffenden Wassers, Cl die titrimetrisch bestimmte Menge der Chloride im 1 L, K die Carbonathärte (bestimmt nach *Lunge*), F_s den Leitfähigkeitsfaktor für 1° Sulfathärte und F_k den Leitfähigkeitsfaktor für 1° Karbonathärte bedeutet. Die Zahl 3 ist der Leitfähigkeitswert den 1 mgr Cl in 1 L Wasser besitzt. Die Zahl 20 ist der theoretisch errechnete und praktisch nachgeprüfte Wert für die Leitfähigkeit aller übrigen Ionen, welche ein reines Trinkwasser, abgesehen von Chloriden und Erdalkaliverbindungen noch enthalten kann. Es sei noch daran erinnert, daß die Faktoren F_s und F_k, je nach dem Leitfähigkeitswert resp. dem Dissoziationsgrad des betreffenden Wassers verschieden sind: für F_s von 40—36, für F_k 29—22. Bei einem Leitfähigkeitswert von über 850 ist eine Verdünnung mit destilliertem Wasser und eine Berechnung nach einer besonderen Formel notwendig.

Gewisse Wässer schaltet *Fleischer* aus seiner Methode aus:

1. diejenige, welche mehr als 100 mg/l Chloride,
2. solche, die mehr als 30 mg/l Nitrate,
3. solche, welche freie Säuren, freie Alkalien und
4. Alkalibicarbonate enthalten.

Dabei fügt *Fleischer* hinzu, daß bei einer Carbonathärte von weniger als 17° er nie Alkalibicarbonate feststellen konnte und daß über 90% der Wässer in deutschen Städten mit über 10000 Einwohner nach der Statistik von *Bunte* sich zu seiner Härtebestimmungsmethode eignen.

Nun aber enthält unser Leitungswasser*) bei 6—12° Carbonathärte doch ziemliche Menge von Alkalibicarbonaten, so daß die *Fleischer*sche Formel für uns nicht anwendbar war. Um sie für unseres Wasser nutzbar zu machen, sahen wir uns genötigt sie dahin zu modifizieren, daß wir einen Leitfähigkeitsfaktor für Alkalibicarbonate einzuführen suchten.

Dies geschah in der Weise, daß wir zunächst unser Wasser mit $^n/_{10}$ HCl titrierten, dann ließen wir es $^1/_2$ Stunde lang kochen (natürlich unter Nachfüllen mit bidestilliertem Wasser um jegliche Konzentrationsänderung zu verhindern) und titrierten das gekochte Wasser nach Filtration nochmals mit $^n/_{10}$ HCl. Die nun verbrauchte Anzahl ccm $^n/_{10}$ HCl wird durch Alkalibicarbonate gebunden und dient uns als Maßstab für die Menge Alkalibicarbonate, welches das untersuchte Wasser enthält. Beim Titrieren des gekochten Wassers bekommen wir zugleich richtige Angaben für die Carbonatbestimmung nach *Lunge*, da die bei der Titration des ungekochten Wassers verbrauchte HCl-Menge

---

*) Die Kiewsche Wasserleitung wird vom artesischen Wasser gespeist. Dieses stammt aus 2 verschiedenen Wasserhorizonten: der eine befindet sich unter der Kreideformation ca. 72 m tiefer als das Wasserniveau im Dniepr; der zweite unter der Juraformation, ca. 184 m tiefer als das Dnieprniveau [*Zitowitsch*[6])].

nicht nur durch Erdalkalicarbonate, sondern auch durch Alkalibicarbonate gebunden wird. Indem wir aber von den bei der ersten Titration verbrauchten ccm $^n/_{10}$ HCl, diejenigen bei der zweiten Titration gebundenen abziehen, erhalten wir die Anzahl der ccm $^n/_{10}$ HCl, welche tatsächlich den Erdalkalicarbonaten entspricht und welche multipliziert mit 2,8 die Carbonathärtegrade anzeigt. Auf diese Weise erhielten wir also 1. die Carbonathärte nach *Lunge*, 2. diejenige Menge von HCl $^n/_{10}$ in Kubikzentimeter, welche zur Neutralisation der im betreffenden Wasser vorhandenen Alkaliverbindungen nötig ist (diese Menge wird dann auf 1 l berechnet).

Nun erfolgt die Leitfähigkeitbestimmung. Wir führen diese im *gekochten* Wasser aus, was uns zweierlei Vorteile zu bieten schien: 1. haben wir es dann mit einer stabileren (Carbonate) Verbindung, als die Bicarbonate es sind zu tun; 2. bei hohen Leitfähigkeitswerten scheidet beim Kochen die Carbonathärte aus, was die Verdünnung und Umrechnung mit dem Verdünnungsfaktor und dem Leitfähigkeitswert des destillierten Wassers (s. *Fleischer*) unnötig macht. Die Wässer gehören sämtlich in die 1. bis 2. Gruppe (s. oben) und befinden sich also in den besten Bedingungen betreffs der Ionendissoziation.

Was nun die Härteberechnung nach der Leitfähigkeit betrifft, so kann bei unserem Verfahren selbstverständlich nicht die Gesamthärte, sondern bloß die Sulfathärte (wir verstehen darunter die nach dem Kochen des Wassers bleibende Härte) erhalten werden. Die Gesamthärte ergibt sich leicht durch Addition, der aus der Leitfähigkeit gefundenen Sulfathärte mit der nach *Lunge* bestimmten Carbonathärte.

Dem entsprechend wurde die Härteleitfähigkeitsformel von *Fleischer* wie folgt modifiziert:

$$SHL = L - 3\,Cl - 20 - F_{Al}$$

wo SHL Sulfathärteleitfähigkeit und F_{Al} den Faktor, welcher der Leitfähigkeit der Alkaliverbindungen entspricht, bedeutet (übrig. Bez. s. oben).

Bei speziell angestellten Versuchen, welche durch gewichtsanalytische Angaben kontrolliert wurden, haben wir gefunden, daß derjenigen Menge der Alkaliverbindungen, welche 1 ccm $^n/_{10}$ HCl neutralisiert (berechnet auf 1 l) ein Leitfähigkeitsfaktor = 0,511 entspricht.

Die Formel für die Sulfatleitfähigkeit lautet also:

$$SHL = L - 3\,Cl - 20 - 0{,}511\,x\,,$$

wo x die Menge der $^n/_{10}$ HCl in Kubikzentimeter bedeutet (s. oben).

Daraus erhält man leicht die Sulfathärte in Graden:

$$SH^0 = \frac{L - 3\,Cl - 20 - 0{,}511 \cdot x}{F_s}$$

und die Gesamthärte:

$$H^0 = \frac{L - 3\,Cl - 20 - 0{,}511 \cdot x}{F_s} + K^0 .$$

K^0 = Carbonathärte nach *Lunge*.

Unser Vorgehen begreift also folgendes:

1. Titration des *ungekochten* Wassers mit $^n/_{10}$ HCl;
2. Titrieren des *gekochten* Wassers mit $^n/_{10}$ HCl;
3. Berechnung der durch Alkali gebundenen $^n/_{10}$ HCl Menge auf 1 l Wasser.
4. Bestimmung der Carbonathärte nach *Lunge*;
5. Bestimmung der Chloride;
6. Bestimmung des Leitfähigkeitswertes im gekochten Wasser;
7. Berechnung der Sulfathärte aus der Leitfähigkeit;
8. Berechnung der Gesamthärte.

Die Ergebnisse der Härtebestimmungen in einigen Kiewschen artesischen Brunnen und Wasserreservoiren sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1.

Wasser	Leitfähigkeit $L_{18} \cdot 10^6$		Carbonathärtegrad nach *Lunge*	Sulfathärtegrad aus Leitfähigk.	Gesamthärtegrad aus		Differenz	Gesamthärte nach *Winkler*, *Wartha-Silber*	Abdampfrückst. aus		Differenz
	ungekocht. Wasser	gekocht. Wasser			Leitfähigkeit	Gewichtsanalyse			Leitfähigkeit	Gewichtsanalyse	
1. Reservoir S. . . .	490,9	169,6	11,76	3,91	15,67			15,12	343,6		
2. Art. Br. a	507,3	152,4	12,32	2,48	14,8			15,68	355,1		
3. „ „ b . . .	528,1	157,8	12,88	2,77	15,65	16,3	− 0,65	16,24	369,6	360,0	+ 9,[illegible]
4. „ „ c	491,8	172,3	11,2	2,82	14,02	14,3	− 0,28	14,0	343,3		
5. W.-L.-Hahn 1 . . .	494,6	162,3	11,76	2,72	14,48			15,68	346,2		
6. Art. Br. d	494,4	168,8	11,76	3,16	14,92			15,12	346,1		
7. Reservoir N. . . .	550,2	272,3	10,64	4,49	15,13				385,1		
8. Art. Br. Juraform. .	542,2	358,0	6,72	6,44	13,16	12,33	+ 0,83		379,5	371,2	+ 8,3
9. „ „ Kreideform.	548,7	211,2	13,44	3,5	16,94	16,39	+ 0,55		384,1	387,2	− 3,1
10. W.-L.-Hahn 2 . . .	535,9	309,6	8,4	5,4	13,8			15,8	375,1		
11. „ 3 . . .	468,1	161,4	11,76	2,83	14,59			16,5	327,7		
12. „ 4 . . .		235,6	11,76	3,63	15,39			16,0			
13. Reservoir G. . . .	518,7	358,3	6,72	6,67	13,39	13,0	+ 0,39	14,7	363,6	372,7	− 9,1
14. Art. Br. e	507,7	184,3	11,76	3,3	15,06			15,68	353,4	353,7	− 0,[illegible]
15. „ „ f	499,0	343,3	6,72	6,21	12,93	13,6	− 0,67	14,2	349,3	374,5	− 2[illegible]
16. „ „ g	540,0	352,2	7,28	6,47	13,75	12,8	+ 0,95		378,0	374,2	+ 3,[illegible]
17. „ „ h	532,8	340,9	7,28	5,74	13,02	12,86	+ 0,16		373,0	368,9	+ 4,1
18. W.-L.-Hahn 5 . . .	495,1	189,2	10,64	3,5	14,14			15,68	346,6		
19. „ 6 . . .	539,3	262,2	10,08	4,27	14,35			14,0	377,5		
20. Art. Br. i	555,1	373,7	6,16	6,79	12,95	12,25	+ 0,7	12,32	385,7	368,6	+ 1[illegible]
21. Reservoir L. . . .	497,7	175,8	11,76	3,19	14,95			15,68	348,4		

Abkürzungen: Art. Br. = artesischer Brunnen; W.-L.-Hahn = Wasserleitungshahn.

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, ist die Differenz zwischen der Leitfähigkeitshärte und der gewichtsanalytischen im Maximum = 0,95 im Mittel = 0,55.

Unsere Leitfähigkeitswerte (bestimmt im ungekochten Wasser) haben wir auch zur Bestimmung des Abdampfrückstandes benutzt. Zur Berechnung haben wir den Faktor 0,7, welcher von russischen Autoren *Doroschewsky* und *Dworschantschik* angegeben wird, angenommen (die genannten Autoren geben für russische Wässer genau den Faktor 0,695 an). Die erhaltenen Werte gaben zuweilen beträchtliche Schwankungen wie aus der Tabelle zu ersehen ist.

Unsere Modifikation des *Fleischer*schen Verfahrens hat also gute Resultate ergeben und ist praktisch unter unseren Verhältnissen (Notwendigkeit zur Carbonatbestimmung nach *Lunge* das Wasser kochen zu lassen) nicht besonders umständlich. Der Vergleich der Leitfähigkeitswerte des ungekochten und des gekochten Wassers hat für uns noch eine rein praktische Bedeutung: er erlaubt jederzeit zu kontrollieren, ob das Wasser in Stellen, wo gekochtes Wasser abgeliefert sein muß (Eisenbahnstationen, Dampfschiffe usw.) auch wirklich die vorgeschriebene Zeitfrist gekocht hat.

Zusammenfassung.

1. Mittels des modifizierten *Fleischer*schen Verfahrens konnten wir auch in alkalibicarbonathaltigem Wasser die Härtebestimmung mit Hilfe der elektrischen Leitfähigkeit ausführen.

2. Den Abdampfrückstand haben wir durch Multiplikation mit dem Faktor 0,7 erhalten.

3. Der Vergleich der Leitfähigkeitswerte des gekochten und des ungekochten Wassers ermöglicht eine leichte Kontrolle über die Abkochung des Wassers.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Fleischer*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **104**, H. 1/2. 1925. — [2]) *Weldert*, zit. nach *Fleischer*. — [3]) *Karaffa-Korbut*, zit. nach *Fleischer*. — [4]) *Doroschewsky* und *Dworschantschik*, Journ. des Russ. Physikalisch-chemisch. Gesellsch. 1913, Nr. 7. (Russisch.) — [5]) *Wassiliewa*, Hygiene und Sanitätswesen 1917. (Russisch.) — [6]) *Zitowitsch*, Das Kiewsche Wasser. (Russisch.) 1915.

(Aus dem Institut „Robert Koch“, Berlin. — Abteilungsleiter: Prof. Dr. *Boecker*.)

Keimumwandlung und Lysinwirkung.

Von

Dr. **Fritz Kauffmann,**

Assistent am Institut.

Das Problem der natürlichen und künstlichen Keimumwandlung im Tierkörper und in der Kultur hat besonders in letzter Zeit erhöhte Aufmerksamkeit gefunden. Um in den Mechanismus der natürlichen Keimumwandlung tiefer eindringen zu können, erschien mir die künstliche Keimumwandlung in der Kultur mit Hilfe des bakteriophagen Lysins geeignet. Diese Gegenüberstellung von Keimumwandlung und Lysinwirkung ist um so weniger gezwungen und willkürlich, als wir uns wohl daran gewöhnen müssen, mit Lysinwirkung als einer sehr häufigen Begleiterscheinung in gewissen Bakterienkulturen und im Tierkörper zu rechnen. Es braucht dabei keineswegs immer zur sichtbaren Lyse, die nur einen extremen Fall darstellt, zu kommen. Nun sind aber Spuren von bakteriophagem Lysin nicht ohne weiteres nachweisbar; es fehlt uns sozusagen ein chemisches Reagens auf Lysin, das bereits Spuren dieser Substanz anzeigt. Unsere Lysinnachweismethoden bedürfen stets lebender Bakterien, deren Empfindlichkeit oder Resistenz gegen Lysin großen Schwankungen unterworfen ist. Gewiß stehen uns Anreicherungsmethoden vermittels Passagenfiltration zur Verfügung, doch können wir andererseits dabei nicht sicher entscheiden, ob das Lysin von vornherein vorhanden war oder erst bei der Passagenzüchtung entstanden ist.

Über Keimumwandlungen im Reagensglas durch Lysinzusatz finden sich in der Literatur zahlreiche Beobachtungen, die von *Otto* und *Munter* in Weichardts Ergebnissen und an anderer Stelle dargestellt sind. Herausgehoben seien hier nur folgende Resultate:

Bordet und *Ciuca* haben die Veränderungen an Colibacillen, die aus lysinhaltigen Medien gezüchtet waren, eingehender studiert. Sie gewannen aus dem normal wachsenden, lysinempfindlichen, möglicherweise auch spontan lysinbildenden Coli eine schleimig wachsende lysinresistente Abart, die selbst aber noch lysogen, d. h. Träger des lytischen Prinzips war. Erst nach mehreren Passagen ging die lysogene Wirkung verloren. Diese Form verhielt sich auch gegenüber antibakteriellen Antikörpern refraktär; sie wurde z. B. nicht von dem Immunserum, das mit dem normalen Ausgangsstamm hergestellt war, agglutiniert. Aber

auch das mit dem schleimigen Coli hergestellte Immunserum agglutinierte weder den eigenen schleimigen Stamm noch den normalen Ausgangsstamm, obgleich dieses Serum mit der Lysinbouillon eine Präcipitation ergab (!). Das Immunserum des schleimigen Coli hatte antilytische Fähigkeit.

Bei Antilysinzusatz und längerer Passagenzüchtung schlug der schleimige Coli wieder in die Ausgangsform zurück, schließlich wurde er auch wieder lysinempfindlich. Zur Übersicht sei hier die von *Otto* und *Munter* zitierte Tabelle der *Bordet*schen Versuche wiedergegeben:

	Neutralisierte	präcipitierte	Agglutinierte den Colistamm	
	die Lysinbouillon		normal	resistent
1. Serum gegen den normalen Coli .	—	+	+	—
2. „ „ „ resistenten „ .	+	+	—	—
3. Antilysin	+	+	+	—

Das Antilysin wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit Lysin gewonnen.

Zahlreiche andere Untersucher wie *Brunoghe* und *Maisin, Eliava* und *Pozerski, Gratia, Otto, Munter* und *Winkler, Bail* u. a. haben die Befunde von *Bordet* und *Ciuca* teils bestätigt, teils neue Beobachtungen hinzugefügt, z. B. *Gratia*, der eine erhöhte Virulenz des schleimigen, lysinresistenten Coli im Tierversuch beschrieb. *Otto, Munter* und *Winkler* erwähnen Typhus- und Flexner-Stämme, die unter Lysineinfluß den Drigalski-Nährboden mehr oder weniger röteten. Ferner weisen sie darauf hin, daß einzelne Bakterienkulturen aus unbekannter Ursache spontan resistent gegen das Lysin werden können, daß diese Resistenz künstlich durch Behandeln der Kulturen mit Lysin erzeugt werden kann, und daß schließlich die resistenten Keime nicht immer „Virusträger“ zu sein brauchen. Erst kürzlich hat *Sophie Kasarnowsky* eine andere Art der Gewinnung lysinresistenter Stämme mitgeteilt, und zwar durch Züchtung des empfindlichen Stammes im sterilen Kulturfiltrat eines lysinresistenten Stammes. Auf diesen eigenartigen Befund sei weiter unten eingegangen, hier sollen nur die Agglutinationsergebnisse wiedergegeben werden. Das Immunserum, das mit dem resistenten Stamm hergestellt war, agglutinierte den normalen, empfindlichen Ausgangsstamm nicht, wohl aber, im Gegensatz zu den Befunden von *Bordet*, den resistenten Stamm. Das Immunserum, das mit dem normalen sensiblen Stamm hergestellt war, agglutinierte nur den normalen, nicht den resistenten Stamm. Diese Ergebnisse von *Kasarnowsky* in einer Tabelle:

	Agglutinierte den Coli normal	resistent
1. Serum gegen den normalen Coli	+	—
2. „ „ „ resistenten „	—	+

Schließlich hat *Seiffert* aus dem Uhlenhuthschen Laboratorium Typenveränderungen in der Paratyphusgruppe unter Lysinwirkung mitgeteilt; doch sei hier nicht näher auf die komplizierte und noch fragliche Differenzierung innerhalb der Paratyphusgruppe eingegangen.

Die folgenden Untersuchungen sind mit Colibacillen ausgeführt worden, zunächst mit dem aus früheren Arbeiten schon bekannten Coli H und dem Lysin H. Der Colistamm H ist ein typischer, normal wachsender, mäßig beweglicher Colistamm, der gegen das Lysin H sehr

empfindlich ist und in letzter Zeit auch zuweilen spontan Lysin bildete. Das Lysin H ist gegen den Colistamm H bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} bis 10^{-10} wirksam, ebenso auch gegen manche heterologe Colistämme, wie den Colistamm 800, einen Coli-Mutaflorstamm 103 (den Herr Prof. *Nissle*, Freiburg, freundlichst zur Verfügung stellte) und gegen Flexner- und Y-Ruhrstämme. Mit dem lebenden Coli H war ein Kaninchen 171 intravenös immunisiert worden; dieses Serum agglutinierte den Stamm CH (CH = Coli H) bis zu einer Verdünnung von 1 : 50 000, und zwar in den Anfangsverdünnungen typisch grobflockig. Später sank der Titer auf 1 : 10 000. Auch mit dem Lysin H war ein Kaninchen 83 intravenös immunisiert worden; dieses Serum neutralisierte das Lysin bis zu einer Verdünnung von 1 : 200, außerdem agglutinierte es den Stamm CH bis zu einer Verdünnung von 1 : 1600. Genauere Angaben hierüber finden sich in meiner Arbeit: Über die Beziehungen zwischen dem d'Herelleschen Lysin, dem Antilysin und den „Autotoxinen" (*Conradi-Kurpjuweit*).

Die künstliche Gewinnung eines lysinresistenten, schleimigen Coli-H-Stammes (im folgenden stets CHr genannt) durch Behandlung der Kultur mit Lysin H gelang leicht und wiederholt. Zwar geschieht es häufig, daß die Lysin-Colikulturen nach 1, 2, 3 bis 6 Tagen Bebrütung klar bleiben oder es nachträglich werden; besonders wenn sofort nach Beimpfung Lysin zugesetzt war. Die meisten dieser Kulturen trüben sich, auch wenn sie später bei Zimmertemperatur gehalten werden, nach verschiedenen Zeiten diffus — in der Regel ein Zeichen dafür, daß nun ein lysinresistenter Stamm angegangen ist. Zum Beispiel: Zu einem Kolben 24stündiger CH-Bouillonkultur oder auch frisch mit CH beimpfter Bouillon werden einige Tropfen unverdünnten oder beliebig verdünnten Lysins gegeben und die Kulturen ein oder besser mehrere Tage bei 37° bebrütet. In unserem ersten Falle ergab die Ausspatelung auf Drigalski-Agar einer mit Lysin versetzten Bouillonkultur nach 4 Tagen Bebrütung neben typischen Flatterformen von Coli zahlreiche dick schleimig wachsende, weißliche, teils runde, teils gezackte Kolonien. Von dieser Platte wurde eine Reinkultur des schleimigen Stammes, CHr, angelegt und auf Schrägagar weitergezüchtet. Die genaue Prüfung dieses Stammes im Vergleich zu dem normalen Stamm CH zeigte zunächst eine vollständige Resistenz gegen das Lysin H, ferner keinerlei Agglutination durch das Immunserum gegen den normalen Colistamm H und durch das Antilysin (83). Im folgenden nennen wir immer zur Abkürzung das Immunserum gegen den normalen Colistamm H = „Immunserum normal", das Immunserum gegen den resistenten Colistamm, CHr, = „Immunserum resistent". Im Absättigungsversuch banden die schleimigen Bacillen kein Agglutinin. Dagegen verhielten sie sich in ihrem sonstigen biologischen Verhalten

wie in der Zuckervergärung (bunte Reihe) genau so wie der Ausgangsstamm. Saccharose wurde nicht vergoren. Bouillon wurde diffus getrübt, war aber infolge der starken Schleimbildung dick zähflüssig. Die Bacillen waren mäßig beweglich und für weiße Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen in großen Dosen nicht pathogen. Die Prüfung auf lysogene Wirkung erfolgte erst nach 5 Agarpassagen und ergab ein negatives Resultat. Dementsprechend ist es auch nicht verwunderlich, wenn das mit dem Stamm CHr hergestellte Immunserum keine antilytischen Eigenschaften hatte. Dieses Immunserum wurde dadurch gewonnen, daß ein Kaninchen 149 mit lebenden CHr-Bacillen intravenös immunisiert wurde. Die zur Immunisierung und späteren Agglutination notwendigen Kulturen wurden alle gleichzeitig auf Schrägagar angelegt und nach 24stündiger Bebrütung bei 37° im Eisschrank aufgehoben. Diese Maßnahme ist in jedem Falle notwendig, da man sonst nicht sicher geht, ob der Stamm sich inzwischen bei zahlreichen Überimpfungen ändert oder gar zurückschlägt. (Eine Fehlerquelle, die bei allen derartigen Untersuchungen berücksichtigt werden muß.) Das auf diese Weise mit einem einheitliche Material gewonnene „Immunserum resistent“ agglutinierte den normalen Colistamm H genau so wie das „Immunserum normal“ bis zur Verdünnung von 1 : 10 000, und zwar in den Anfangsverdünnungen typisch grobflockig. Der Stamm CHr wurde von seinem „Immunserum resistent“ bis zur Verdünnung von 1 : 800 grobflockig agglutiniert; doch waren die Flocken makroskopisch von einer anderen Beschaffenheit als die Flocken des Stammes CH. Während die CH-Flocken locker und leicht gänzlich zerschüttelbar waren, zeigten sich die CHr-Flocken fester, gezackter und schwer, oft gar nicht zerschüttelbar. Diese deutlich feststellbare Verschiedenheit in der Agglutination, die auch langsamer als beim CH-Stamm erfolgte, erwies sich einwandfrei im Castellanischen Absättigungsversuch, für den ich ein Protokoll hier folgen lasse:

Technik.

Immunserum 171 (mit CH hergestellt) = „Immunserum normal“, 5 ccm 1 : 25 in NaCl verdünnt; Immunserum 149 (mit CHr hergestellt) = „Immunserum resistent“, 5 ccm 1 : 25 in NaCl verdünnt und je a) 5 ccm Aufschwemmung CH (1 Agarplatte + 4 ccm NaCl); b) 5 ccm Aufschwemmung CHr 1 Stunde 37°; zentrifugieren; nochmalige Absättigung wie vorher.

Agglutinationsversuch mit den abgesättigten Seren und mit CH und CHr (je 0,5 ccm Serumverdünnung + 0,5 ccm Bacillenaufschwemmung).

Kontrollen: Agglutinationsversuch mit den unabgesättigten Seren und mit CH und CHr. 2 Stunden 37°. 22 Stunden Zimmertemperatur. Ablesen nach 2 und 24 Stunden.

Nomenklatur: ×× = grobflockig; ++ = mit bloßem Auge gut sichtbar, feinflockig; + = mit bloßem Auge schwach, mit der Lupe gut sichtbar; ± = mit bloßem Auge nicht, mit der Lupe schwach sichtbar; — = negativ.

Resultat nach 24 Stunden.

	200	400	800	1600	3200	6400	12800	Kontr.
Imm.-Ser. normal, abgesätt. m. CH, aggl. m. CH	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ „ „ „ CHr	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ CHr. „ „ CH	××	××	××	++	++	+	±	—
„ „ „ „ „ „ „ CHr	—	—	—	—	—	—	—	—
„ resistent, „ „ CH, „ „ CH	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ „ „ „ CHr	××	××	××	—	—	—	—	—
„ „ „ „ CHr, „ „ CH	××	××	××	++	++	+	—	—
„ „ „ „ „ „ „ CHr	—	—	—	—	—	—	—	—
„ normal, unabges. „ „ „ „ CH	××	××	××	++	++	+	+	—
„ „ „ „ „ „ „ CHr	—	—	—	—	—	—	—	—
„ resistent, „ „ „ „ „ CH	××	××	××	++	++	+	±	—
„ „ „ „ „ „ „ CHr	××	××	××	—	—	—	—	—

Agglutinationstabelle.

	Agglutinierte den Coli normal	Agglutinierte den Coli resistent
1. Serum gegen Coli normal	+	—
2. „ „ „ resistent	+	+
3. Antilysin 83	+	—

Das „Immunserum normal“ kann nur durch den Colistamm CH abgesättigt werden, nicht durch den Colistamm CHr.

Das „Immunserum resistent“ kann durch Absättigung mit dem Stamm CH nur seiner Agglutinine für den Stamm CH, nicht für den Stamm CHr beraubt werden; dagegen führt die Absättigung mit dem Stamm CHr nur zum Verlust der Agglutinine für den Stamm CHr, nicht aber für den Stamm CH.

Dieser Absättigungsversuch zeigt, daß der Stamm CH nur einen Receptor hat, auf den im „Immunserum normal“ ein entsprechendes Agglutinin paßt. Wir bezeichnen dieselben mit a (Receptor) und A (Agglutinin).

Gegenüber dem „Immunserum normal“ mit seiner einheitlichen Agglutiningruppe A muß das „Immunserum resistent“ eine doppelte Agglutiningruppe besitzen. Eine dieser Gruppen, B genannt, muß von der dem Stamm CH und dem „Immunserum normal“ eigentümlichen Gruppe (a—A) verschieden sein. Gegen die naheliegende Annahme, daß der andere Antikörpertyp des „Immunserum resistent“ mit der Gruppe A des „Immunserum normal“ identisch ist, spricht anscheinend die Tatsache, daß der Stamm CHr von dem „Immunserum normal“ nicht agglutiniert wird und auch nicht imstande ist, aus dem „Immunserum normal“ die Agglutinine A herauszunehmen. Meines Erachtens liegt jedoch in diesem Falle kein zwingender Grund vor, aus dem Fehlen

der Agglutination und der Bindung auf einen Mangel spezifischer Beziehungen zu schließen. Wahrscheinlich haben wir es mit einer rein äußerlich bedingten Erscheinung zu tun: Die Schleimhülle schließt den spezifischen Bakterienkern von der Umgebung ab. Nach Verlust des schleimigen Wachstums tritt, wie unten beschrieben werden soll, wieder Agglutination und Bindung der Agglutinine des „Immunserum normal" ein.

Der Doppeltyp des „Immunserum resistent" läßt sich aber noch auf folgende, vielleicht noch ungezwungenere Weise dem Verständnis näher bringen.

Wie noch zu besprechen sein wird, schlagen die schleimigen Stämme bisweilen spontan (nach *Bordet* und *Ciuca* unter der Einwirkung eines spezifischen Serums) in die Ausgangsform zurück. So erscheint es durchaus möglich, daß bei der iv. Vorbehandlung des Kaninchens mit dem schleimigen Colistamm im Organismus des Tieres ein Teil der Keime in die Normalform zurückschlägt. Durch antigene Wirkung dieser Bacillen würde dann das dem „Immunserum normal" zugehörige A-Agglutinin erzeugt werden und somit eine Art Mischserum das Endresultat sein. Im Rahmen dieser Vorstellung würde dem schleimigen Stamme CHr nur ein von dem des normalen Stammes verschiedener Receptor B zuzusprechen sein.

Wie bereits soeben gesagt, ist es gelungen, den schleimigen CHr-Stamm einfach durch längere Fortimpfung über Agar nach mehreren Passagen zum teilweisen Umschlag in die Ausgangsform zu bringen. Eine Reinkultur dieser zurückgeschlagenen Rasse, „CHr normal" genannt, ließ sich in keiner Weise von der Ausgangsform unterscheiden. Im Abbindungsversuch nach der oben beschriebenen Technik (2 Seren und 3 Stämme) verhielt sich der Stamm „CHr normal" genau so wie der Stamm CH. Es war bei ihm auch eine vollständige Lysinempfindlichkeit eingetreten. Zu diesem Rückschlag ist also kein Antilysinzusatz (*Bordet* und *Ciuca*) notwendig.

Übrigens konnte die von *Bail* beschriebene antilytische Fähigkeit des Schleimes nicht nachgewiesen werden, auch die Schleimbacillen selbst wirkten nicht antilytisch.

Zur Ergänzung der mit dem Coli H ausgeführten Versuche wurden Lysinfestigungsversuche mit dem aus Stuhl gezüchteten Colistamm 800 angesetzt, der ebenfalls gegen das Lysin H empfindlich war. Bei der Festigung dieses Stammes C 800 gegen das Lysin H trat ebenfalls eine schleimige Umwandlung auf, C 800 r genannt, die sich aber von dem Stamm CHr unterschied. Während es sich beim CHr mehr um lockeren, voluminösen, nur wenig fadenziehenden Schleim handelte (der übrigens zuweilen typische Wallbildung zeigte), war der Schleim des C 800 r fester und enorm fadenziehend. Berührte man z. B. mit der Öse zum

Abimpfen die Platte, so hatte man bis zu 30 cm lange, spinnengewebeartige Fäden an der Öse hängen.

Die hervorstechende Eigenschaft dieses Stammes C 800 r war aber seine gesteigerte Virulenz. Von dem normalen Stamm C 800 sowie von CH und CHr vertragen Kaninchen erfahrungsgemäß 1—2 Ösen, lebend i. v. injiziert, ohne Schaden, gegen Ende der Immunisierung sogar bis zu 10 Ösen. Dagegen tötete $^1/_2$ Öse C 800 r, lebend i. v. injiziert, ein kräftiges Kaninchen nach 2 Tagen. Aus Herzblut, Galle und Peritoneum wurden Reinkulturen von schleimigen Colibacillen C 800 r gezüchtet. Sonst waren am Tier makroskopisch keinerlei Veränderungen sichtbar. Das Kontrolltier, das $^1/_2$ Öse C 800 lebend i. v. erhielt, lebte noch nach mehreren Wochen. Ein weiteres kräftiges Kaninchen erhielt darauf nur $^1/_{10}$ Öse C 800 r lebend i. v. Das Tier wurde nach 2 Tagen krank und starb nach 8 Tagen. Die Sektion ergab eine doppelseitige Pneumonie; aus Herzblut, *Lunge*, Galle und Peritoneum wurden dieselben schleimigen Colikolonien gezüchtet. Der aus der Lunge gezüchtete schleimige Stamm wäre von einem Uneingeweihten höchst wahrscheinlchi für Pneumobacillus Friedländer gehalten worden.

Von zwei gleichgroßen Meerschweinchen erhielt Nr. 1 2 ccm 24stündige Bouillonkultur C 800 und Nr. 2 2 ccm 24stündige Bouillonkultur C 800 r intraperitoneal. Das 4 Stunden nach der Injektion mit der Capillare entnommene Peritonealexsudat von Nr. 1 (C 800) zeigte massenhaft Leukocyten mit vereinzelten phagocytierten und sehr wenigen extracellulären Bacillen. Das Peritonealexsudat von Nr. 2 (C 800 r) bot ein gänzlich anderes Bild; es war zähschleimig, enthielt massenhaft extracelluläre Bacillen und nur sehr wenig Leukocyten, fast ohne Phagocytose. Die Kultur des Peritonealexsudates ergab bei Nr. 1 normale Kolonien von C 800, bei Nr. 2 schleimige Kolonien C 800 r. Nach 24 Stunden war Meerschweinchen Nr. 2 tot, hatte ein schleimiges Peritonealexsudat; die Kultur aus Herzblut und Peritoneum ergab eine Reinkultur von schleimigem Coli. Das Meerschweinchen Nr. 1 blieb am Leben.

Es ist also in der Tat unter der Lysinwirkung in der Bouillonkultur eine virulente, offenbar gegen die Phagocytose resistente Form des Colibacillus 800 entstanden.

Außer diesen schleimigen lysinresistenten Formen, die nur in einem gewissen Prozentsatz auftreten, sind fast stets in jeder Lysinkultur lysinresistente Kolonien aufgetreten, die sich makroskopisch und kulturell durch nichts von der lysinempfindlichen Normalform unterscheiden. Es ist also keineswegs zur Lysinresistenz Schleimbildung erforderlich; diese scheint nur eine exzessive Umwandlung zu sein. In einem Falle entstand aus einer C 800 - Lysinkultur eine Form, die den von *Bernhardt, v. Lingelsheim* u. a. beim Typhus und Paratyphus be-

schriebenen Q-Formen entsprach. Sie war hart, trocken, geriffelt, haftete dem Nährboden fest an, war auf Drigalski-Agar intensiv rot, lysinresistent und gab starke Spontanagglutination in NaCl. Diese Befunde zeigen mit großer Deutlichkeit, wie verschieden die Reaktionsweise des Bakteriums auf das Lysin sein kann. Aus diesem Grunde sind auch die voneinander abweichendenResultate der einzelnen Autoren hinsichtlich der Agglutination verständlich; es kommen alle Übergänge vor. Nur einer Ansicht von *Sophie Kasarnowsky* möchte ich hier widersprechen, nämlich ihrer Erklärung, daß das Auftreten lysinresistenter Bacillen bei Züchtung im Kulturfiltrat von lysinresistenten Stämmen durch besondere, filtrierbare, bisher unbekannte Stoffwechselprodukte der resistenten Bacillen verursacht werde. Zunächst sei ihre Versuchsanordnung kurz wiedergegeben: Das Filtrat einer 24stündigen Bouillonkultur des lysinresistenten Coli Nr. 1 wurde 48 Stunden lang im Brutschrank bei 37° auf Sterilität geprüft. Ob es auch auf Lysinfreiheit geprüft wurde, ist nicht gesagt. In dieses Filtrat wurde ein frisch gezüchteter Colistamm „Anopko", der lysinempfindlich war, geimpft und in Passagen täglich fortgeimpft. Nach der 4. Passage erwies sich der Stamm Anopko als lysinresistent und unterschied sich in nichts von dem durch Züchtung in Lysin gewonnenen resistenten Stamm „Anopko". Gegen die Erklärung, daß das Filtrat festigende Eigenschaften hatte, ist folgendes einzuwenden:

Zunächst fehlt die Angabe, ob das Filtrat von Coli 1 vollkommen lysinfrei war. Es genügt ferner gerade beim Arbeiten mit lysinresistenten Stämmen nicht, als Sterilitätsprobe ein Klarbleiben der 48 Stunden bebrüteten Filtrate anzusehen. Entsprechend der Forderung von *Otto* und *Munter* müssen nach länger dauernder Bebrütung wiederholte Lysin-Titerbestimmungen des klaren Filtrates gemacht werden. Auf diese Weise kann man bei Lysin-Titersteigerungen erst nachweisen, daß im Filtrat trotz des Klarbleibens Keime vorhanden sind. Ein wirklich keimfreies Lysin darf keine Titersteigerung aufweisen. Nach eigenen Erfahrungen kommt es häufig vor, daß anfangs klare Filtrate nach tagelanger Bebrütung oder nach Aufenthalt bei Zimmertemperatur erst nach 2—6 Tagen sich langsam zu trüben anfangen, und daß diese Trübung das Entstehen eines lysinresistenten Stammes zur Ursache hat. Nehmen wir aber an, daß das Filtrat von Coli Nr. 1 tatsächlich absolut keim- und lysinfrei war, so müßte noch ausgeschlossen werden, daß mit der Beimpfung des lysinempfindlichen Coli „Anopko" Spuren von Lysin übertragen wurden oder auch erst in der neuen Kultur entstanden. *Kasarnowsky* gibt allerdings an, daß Spontanlysinbildung in den Passagen nicht auftrat. Ob diese Feststellung aber durch Anreicherung vorhandener minimalster Lysinmengen geschah, ist nicht gesagt worden. Aber selbst wenn wirklich auch in den Passagen kein Lysin vorhanden

war, so bleibt noch die Möglichkeit, daß, wie *Otto*, *Munter* und *Winkler* angeben, und wie ich es auch selbst beobachtet habe, lysinempfindliche Kulturen auch ohne Lysinwirkung, scheinbar spontan, resistent werden können. Es genügen vielleicht zu dieser Spontanfestigung, die z. B. bei reiner Agarpassage auftreten kann, minimalste Lysinmengen, die aber durch die resistenten Bacillen selbst gebunden sind und dann im Kulturfiltrat nicht nachweisbar sind. Solange wir diesen letzten Punkt der spontanen Lysinresistenz nicht sicher entscheiden können, ist die Schlußfolgerung von *Kasarnowsky* nicht beweisend; besonders nicht in dem vorliegenden Falle, in dem die notwendigen Lysin- und Sterilitätskontrollen fehlen.

Trotz der soeben genannten Einwände wurde der Versuch mit den Filtraten der durch Lysinbehandlung künstlich resistent gemachten Stämme CHr und C 800 r gemacht. Hierbei erwies sich das Filtrat von Coli 800 r als stark lysinhaltig und mußte demzufolge ausgeschaltet werden. Das Filtrat von CHr war bei 6 Tage langer Bebrütung und wiederholten Lysintiterbestimmungen keim- und lysinfrei. Auch wurden fraktionierte Aussaaten in 50 ccm Bouillon gemacht. In dem unverdünnten Filtrat CHr wurde nach der Methode von *Kasarnowsky* Coli H in Passagen fortgezüchtet. Selbst nach der 8. Passage und nach mehrtägiger Bebrütung der einzelnen Passagen war keine Spur von Lysinresistenz des Stammes CH nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen frühere, nicht veröffentlichte Versuche von *Munter*, die genau so negativ ausfielen. Wir können also heute nur sagen, daß lysinempfindliche Stämme spontan oder durch Behandlung mit Lysin resistent werden können.

Wie vorsichtig man bei der Entscheidung, ob in einem Filtrat Lysin enthalten ist oder nicht, sein muß, zeigt folgender Versuch:

Das Filtrat einer 24stündigen Coli-99a-Kultur (Mutaflor von Prof. *Nissle*, Freiburg) zeigte im Auftropfverfahren nach *Otto* und *Munter* keine Lysinwirkung gegen den sonst sehr lysinempfindlichen CH-Stamm, minimale Wirkung gegen den eigenen Stamm C 99a (mit der Lupe 3—4 kleinste Taches sichtbar), dagegen deutliche, mit bloßem Auge sichtbare Lysinwirkung gegen einen anderen Mutaflorstamm C 103c (zahlreiche, ca. 100, Taches). Es empfiehlt sich also, zum Lysinnachweis mehrere Stämme gleichzeitig zu benutzen.

Diese auf Grund der Untersuchungen am Bacterium Coli gewonnenen Anschauungen sind auch an anderen Bakterienarten nachgeprüft worden. Besonders interessierte hier das Verhalten der Typhusbacillen hinsichtlich ihrer schwankenden grob- und feinflockigen Agglutination durch Immunserum. An dieser Stelle sollen nur kurz einige Resultate mitgeteilt werden. Aus einem Typhusstamm Posen, den ich nebst dem dazu gehörigen Lysin Herrn Geheimrat *Otto* verdanke, wurde durch

Einwirkung des Lysins Posen eine Rasse gezüchtet, die von dem Typhusimmunpferdeserum (Titer 1 : 10 000) nicht agglutiniert wurde. Der normale lysinempfindliche Ausgangsstamm wurde von dem Immunserum bis zur Titergrenze agglutiniert, und zwar in den Anfangsverdünnungen grobflockig. Der umgewandelte, nicht agglutinable Typhusstamm war lysinresistent geworden und wuchs auf Drigalski-Agar dicker, schleimiger und weißlicher als der normale Stamm. Nach 2 Agarpassagen begann er wieder zurückzuschlagen und wurde von dem Immunserum gering und feinflockig agglutiniert.

Ebenso gelang es gelegentlich, nicht regelmäßig, durch Behandeln von Ruhrstämmen mit Lysin die stark grobflockige, spezifische Ruhragglutination in eine feinflockige Agglutination zu verwandeln. Auf die praktische Bedeutung dieser Tatsachen, nämlich der aufgehobenen oder herabgesetzten Agglutinabilität bei der bakteriologischen Stuhl- und Urindiagnostik braucht nicht näher eingegangen zu werden.

Auf die möglicherweise menschenpathogene Wirkung lysinresistenter, schleimiger oder nichtschleimiger Colistämme sei anläßlich eines Befundes kurz hingewiesen: F. erkrankt akut an Durchfällen. Eingesandter milchiger, reiswasserähnlicher Stuhl erweckt Verdacht auf Cholera. Cholerauntersuchung negativ, ebenso Typhus, Paratyphus, Ruhr. Dafür fast Reinkultur eines schleimigen Coli mit ganz vereinzelten normalen Colikolonien. Der schleimige Stamm, der sich biologisch sonst ganz wie ein Coli, z. B. der CHr, verhielt, war gegen das Lysin H resistent; dagegen war der normale Colistamm aus diesem Stuhl hoch lysinempfindlich. Man könnte diesen schleimigen Stamm auch Bact. lactis aerogenes nennen, wahrscheinlich nur ein anderer Name für ein und dasselbe Bacterium, da eine durchgreifende Trennung weder makroskopisch, mikroskopisch noch kulturell möglich ist.

Nach weiteren 8 Tagen wurde von F. erneut Stuhl, diesmal von normalem Aussehen, eingesandt. Die Kultur ergab eine Reinkultur von normalem Coli, der hoch lysinempfindlich war. Ferner gelang es, den normalen Coli aus der ersten Stuhleinsendung sowie den normalen Coli aus der zweiten Einsendung durch Behandeln mit Lysin in die typische, schleimige, lysinresistente Coliform umzuwandeln. Diese Form unterschied sich in nichts von dem schleimigen Coli, der im ersten Stuhl fast in Reinkultur vorhanden war. Nähere klinische Angaben waren leider nicht zu erhalten.

Dieser Befund (schleimige Colistämme wurden später noch häufiger beobachtet) weist auf die Möglichkeit einer pathogenen Wirkung lysinresistenter Colistämme beim Menschen hin. Vielleicht beruht das Versagen der bisherigen Lysintherapie am Menschen auf dem fast regelmäßigen Entstehen lysinresistenter Rassen. Es erscheint jedenfalls notwendig, auf Lysinresistenz und die damit verbundene Umwandlung

mehr als bisher zu achten. Auf die nahe Verwandtschaft zwischen Bact. coli, lactis aerogenes und Pneumobacillus Friedländer ist schon früher, z. B. von *Kruse*, hingewiesen worden. Ob sogar an eine Identität des Pneumobacillus Friedländer mit dem lysinresistenten, schleimigen Coli zu denken ist, muß weiterer Prüfung vorbehalten bleiben. Die an Colibacillen dargelegten Beziehungen zwischen Lysinresistenz, Schleimbildung, Inagglutinabilität und erhöhter Virulenz bieten ein gewisses Analogon zu den von *Wreschner* eingehender studierten Zusammenhängen von Schleimbildung, Virulenz und Festigkeit gegen spezifische Antikörper bei Tetragenus; wie auch die Bedeutung der Schleimkapseln für die Virulenz von Milzbrand- und Pestbacillen seit langem bekannt ist. Die erhöhte Pathogenität wird in diesen Fällen auf Resistenz gegen die Phagocytose zurückgeführt.

Gegen die soeben gegebene Erklärung, daß derartige Umwandlungen z. B. am Coli auf Lysinwirkung zurückzuführen sind, kann eingewendet werden, daß dies nur ein zufälliges Zusammentreffen sei oder noch andere unbekannte Ursachen habe. Dieser Einwand ist von uns selbst von vornherein gemacht worden, und es muß zugeben werden, daß er absolut zwingend bei dem heutigen Stand der Lysinforschung nicht zu widerlegen ist. Für die Wahrscheinlichkeit unserer Annahme spricht aber folgendes:

1. Das sehr häufige Vorkommen von Flatterformen einerseits und schleimigen Formen andererseits, wenn nur einmal der Blick für diese Dinge geschärft ist und genügend darauf geachtet wird.

2. Das Auftreten der schleimigen Umwandlung, z. B. beim Coli H r und 800 r nur in lysinhaltigen Kulturen, niemals in lysinfreien.

3. Das regelmäßige Zusammenfallen von Umwandlung und Lysinresistenz, d. h. wo Umwandlung ist, da ist auch Lysinresistenz, aber nicht umgekehrt; die Lysinresistenz ist vielleicht als Vorstufe zur Umwandlung aufzufassen. Bekanntlich sind früher zahlreiche Bakterienumwandlungen von *Bärthlein*, *Bernhardt*, *Eisenberg* u. a. beschrieben worden, die damals, wo das d'Herellesche Lysin noch nicht bekannt war, in dieser Hinsicht natürlich nicht untersucht worden sind. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß das bakteriophage Lysin bei diesen Keimumwandlungen, wenigstens soweit es sich um die Typhus-Coli-Ruhr-Gruppe handelt, die entscheidende Rolle gespielt hat.

Von allgemeiner Bedeutung scheint mir auch die Tatsache zu sein, daß unter dem Einfluß des Lysins Veränderungen an den Zellen nicht nur regressiver, sondern auch progressiver Natur auftreten können. Schließlich weist auch die Reduktionsförderung des Lysins, die von mir früher beschriebene Gelbreaktion, auf die wachstumssteigernde Wirkung des Lysins, also auf eine erhöhte Aktivität der Zelle unter Lysineinfluß hin.

Zusammenfassung.

1. Es muß mit der sehr häufigen Anwesenheit von bakteriophagem Lysin in Kulturen gewisser Bakterienarten gerechnet werden.

2. Das Entstehen lysinresistenter Stämme ist ein ebenso häufiges Vorkommnis wie das des Lysins überhaupt.

3. Unter der Lysinwirkung, die zur Lysinresistenz führt, können daneben mehr oder weniger weitgehende Keimumwandlungen entstehen. Diese können sich sichtbar äußern in verändertem, insbesondere schleimigem Wachstum, veränderter Agglutinabilität, Antigenwirkung und Virulenz. Wahrscheinlich ist das Lysin als der bedeutendste Faktor für die Keimumwandlung, wenigstens innerhalb der Coli-Typhus-Ruhrgruppe, aufzufassen; möglicherweise ist auch die grob- oder feinflockige Agglutination auf Lysinwirkung zurückzuführen.

4. Es wird auf die Möglichkeit einer menschenpathogenen Wirkung lysinresistenter, schleimiger Colistämme an Hand eines Falles hingewiesen und die Frage der Identität des schleimigen Coli mit dem Bac. lactis aerogenes, vielleicht auch mit dem Pneumobacillus Friedländer, erörtert.

Literaturverzeichnis.

Bail, Med. Klinik **5**, 144. 1923. — *Bordet* et *Ciuca*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **84**, 280, 747, 748. 1921. — *Brunoghe* et *Maisin*, Ebendort S. 847. — *Eliava* et *Pozerski*, Ebendort S. 708. — *Gratia*, Ebendort S. 750. — *Kauffmann*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, Heft 3/4, S. 594 und **106**, Heft 2, S. 308. — *Kasarnowsky*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, Heft 3/4, S. 504. — *Kruse*, Allgemeine Mikrobiologie. 1910. — *Neufeld*, Dtsch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 1. — *Otto* und *Munter*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 52; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**, Heft 3/4, S. 402; Weichardts Ergebnisse **6**. 1924. — *Otto*, *Munter* und *Winkler*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 118. 1922. — *Otto* und *Winkler*, Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 13. — *Seiffert*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **97**. 1926. 4./7. Bericht über die 11. Tagung der deutschen Vereinig. f. Mikrobiologie in Frankfurt a. M. — *Wreschner*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**, 74. 1921.

(Aus der Abteilung für Chemotherapie des Institutes „Robert Koch", Berlin.)

Gewinnung und Eigenschaften von parafuchsinfesten Trypanosomen.

Von

F. Lewy und **M. Gurewitsch.**

Die Arzneifestigkeit der Trypanosomen ist seit *Ehrlich*[1]) eines der bedeutsamsten Phänomene für die Entwicklung der experimentellen Chemotherapie gewesen. Sie ist der Ausgangspunkt jener in theoretischer wie in praktischer Hinsicht überaus fruchtbaren Arbeitshypothese geworden, die als Chemozeptorentheorie bis heute die Vorstellungen und Forschungen auf dem Gebiete der experimentellen Therapie beherrscht. Obgleich die Fülle von Problemen allgemeinbiologischer wie praktisch-therapeutischer Art, die sich an die Beobachtung arzneifester Stämme knüpften, die Aufmerksamkeit der Autoren in starkem Maße in Anspruch genommen und eine vielseitige Bearbeitung gefunden hat, ist die rein technische Seite der Festigung in der Literatur verhältnismäßig selten behandelt worden. Es seien daher im folgenden die Gewinnung eines *parafuchsinfesten Trypanosomenstammes* und einige Versuche, die zur Charakterisierung der erzielten Festigkeit dienen sollen, mitgeteilt.

Die Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe, der das Parafuchsin und ein im Verlauf der folgenden Versuche gleichfalls benutztes halogeniertes Derivat desselben (Tryparosan) angehören, hatte *Ehrlichs* Interesse (l.c.) nicht nur wegen des trypanoziden Effektes einiger ihrer Verbindungen lange Zeit in Anspruch genommen. Die auf diesem Gebiet erzielten Erkenntnisse dienten ihm vielmehr dazu, seine Studien über die Arzneifestigkeit der Protozoen auszubauen. Er konnte zeigen, daß der Festigkeit gegen Triphenylmethanfarbstoffe im Vergleich mit anderen trypanoziden Farbstoffgruppen sowie zu Arsen- und Antimonverbindungen ein streng spezifischer Charakter zukommt.

Diese an der Naganainfektion der Maus gewonnenen Ergebnisse über die Arzneifestigkeit ergänzte *Ehrlichs* Mitarbeiter *Neven*[2]) durch Reagensglasversuche an festen Trypanosomenstämmen, indem er gerade an Hand der Parafuchsinbehandlung der Trypanosomen in vitro die prinzipiellen Unterschiede für die Bewertung des Reagensglas- und des Tierversuches bei Festigungsexperimenten demonstrierte. Über das Tryparosan, seine bessere Verträglichkeit und Überlegenheit gegenüber dem Parafuchsin sowie die eigenartige mitigierende Wirkung auf den Verlauf der Trypanosomeninfektion hat *Rœhl*[3]) berichtet; er machte

dabei die Beobachtung, daß sein gegen Parafuchsin gefestigter Stamm von Tryparosan noch beeinflußt wurde.

Wir bedienten uns in dem folgenden Festigungsversuch der Methode von *Marks*[4]), indem wir den Mäusen Parafuchsin durch Fütterung mit der Schlundsonde in steigenden Dosen zuführten.

Zunächst wurden die Tiere in der üblichen Weise durch subcutane, gelegentlich intraperitoneale Einverleibung einiger Tropfen einer trypanosomenhaltigen Blutaufschwemmung infiziert, und am nächsten Tage, wenn sich keine oder höchstens 2—4 Trypanosomen im Gesichtsfelde fanden, wurden von einer *wässerigen Parafuchsinlösung 0,5 ccm auf 20 g Maus* verfüttert. Die Infektion schritt fort, die Trypanosomen wurden auf neue Mäuse verimpft, wieder in der angegebenen Weise behandelt und so fortgefahren, bis der Stamm maximal gefestigt war.

Dieses Verfahren der Arzneifestigung von Trypanosomen, das auch *Morgenroth* und *Freund*[5]) zur Festigung gegen „Bayer 205" diente, wird bei uns jetzt ausschließlich angewandt. Es unterscheidet sich von der klassischen Festigungstechnik *Ehrlichs* dadurch, daß die Infektion in den Passagen niemals abgeheilt wird, sondern nur eine bestimmte Zeitspanne hindurch die Trypanosomen in einem Milieu gehalten werden, das unterwirksame Konzentrationen des Heilmittels enthält. *Ehrlich* und später auch *Morgenroth* hatten früher die Infektionen durch geeignete, nicht zu große Arzneidosen abgeheilt, das Rezidiv abgewartet, dann die Trypanosomen auf neue Versuchstiere überimpft, unter langsamer Steigerung der Dosis wieder abgeheilt usf., bis schließlich die Dosis maximà tolerata des Heilmittels nicht mehr wirksam war. Das von uns geübte Verfahren führt schneller zum Ziel, und — was für bestimmte Versuchsanordnungen wichtig ist — die Stämme bewahren immunbiologisch den Charakter als „*Ausgangsstämme*", während sonst die festen Stämme *Rezidivstämme* sein mußten. Im Prinzip entspricht unsere Technik der neuerdings von *Voegtlin, Dyer* und *Miller*[6]) angegebenen, unabhängig davon durch *Collier*[7]) beschriebenen Methode, Trypanosomen gegen Arsenikalien dadurch zu festigen, daß man sie längere Zeit in Versuchstieren züchtet, die zuvor mit großen Mengen der Heilmittel behandelt sind. Die im Organismus noch vorhandenen Reste reichen aus, die Gewöhnung der Trypanosomen durchzuführen. Im einzelnen verlief die Festigung folgendermaßen:

Die Tiere erhielten in den beiden ersten Passagen eine *sehr geringe Konzentration* des Mittels, nämlich eine 2proz. Lösung, d. h. etwa $^1/_3$ der Dosis curativa. In der 3.—5. Passage gingen wir bereits auf 4proz. Parafuchsin über, um dann in der 6. Passage auf eine 5proz. Lösung zu steigern. Diese wurde beibehalten bis zur 15. Passage, an die sich 2 Überimpfungen ohne Behandlung der Tiere anschlossen. In der 18. bis 20. sowie in der 23. und 24. Passage gingen wir zu 6proz. Parafuchsin über. Bei der 27. Überimpfung wurde der Stamm erstmalig der höchsten der angewandten Konzentrationen des Farbstoffes, 7% (Dos. tol. maxima)

ausgesetzt, die in der 30. und 32. Passage wiederholt wurde. In keinem der Fälle wirkte das Mittel mehr trypanozid; es bestand also *eine maximale Festigkeit.* Um ein vorzeitiges Erlöschen derselben auszuschließen, wurde der Stamm in der Weise weitergezüchtet, daß die Mäuse regelmäßig am 2. Infektionstage 0,5 ccm Parafuchsin 1 : 500 subcutan (Dosis tolerata) erhielten.

Im Heilversuch an der Maus erwiesen sich Verdünnungen von Parafuchsin 1 : 500 und 1 : 1000 dem festen Stamm gegenüber als *völlig unwirksam.* Die Dosis 1 : 500 führt beim *Normalstamm* in der Mehrzahl der Fälle zu vorübergehender Befreiung der Blutbahn von Trypanosomen (Rezidiv am 5.—7. Tage), ist aber bei einzelnen Tieren gelegentlich auch toxisch. Auch das *Tryparosan war in der Konzentration von 1 : 100 dem parafuchsinfesten Stamm gegenüber unwirksam,* während die Infektion mit normalen Trypanosomen noch durch Tryparosan 1 : 500 ausnahmslos abgeheilt wurde. Zum Unterschied von dem von *Rœhl* (l. c.) beschriebenen Stamm griff also die Festigkeit unseres Stammes auch auf das Tryparosan über, es bestand hier eine wesentlich stärkere Aviditätsverminderung des spezifischen Chemozeptors.

Mit dem festen Stamm wurden ferner eine Reihe von vergleichenden Reagensglasversuchen in der üblichen Anordnung angestellt:

Trypanosomenhaltige Blutaufschwemmungen des normalen bzw. des festen Stammes (0,5 ccm) wurden mit 1 ccm abgestufter Verdünnungen von Parafuchsin in 0,85 proz. Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,5 ccm sterilen inaktiven Pferdeserums vermischt. Nach 1stündigem Aufenthalt im Wasserbad von 37° wurden 0,3 ccm der Trypanosomenaufschwemmung der einzelnen Röhrchen intraperitoneal auf je 1 Maus verimpft und das Verhalten der Infektion in den nächsten 10 bis 15 Tagen beobachtet.

Es ergab sich bei dieser Versuchsanordnung übereinstimmend mit den Versuchen *Nevens* (l. c.), daß der parafuchsinfeste und der normale Stamm in vitro gleich empfindlich waren: noch bei Konzentrationen von 1 : 25 000 wurde die Beweglichkeit der Trypanosomen und ihre Infektionsfähigkeit aufgehoben, bei der Konzentration von 1 : 50 000 geht meist trotz erhaltener Motilität die Infektion nicht mehr an, erst bei Verdünnungen von 1 : 100 000 ist mit dem regelmäßigen Zustandekommen der Infektion zu rechnen. Das gleichartige Verhalten der beiden Stämme in vitro weicht also grundsätzlich von den vorher geschilderten Tierversuchen ab.

Diesen Unterschied in den Resultaten bei der Prüfung der Beeinflußbarkeit arzneifester und normaler Stämme in vivo und in vitro erklärte *Ehrlich* damit, daß im Tierversuch ganz andere distributive Verhältnisse vorliegen als im Reagensglase, wo die ganze Masse des disponiblen Agens unmittelbar und gleichzeitig an die Parasiten herangebracht wird. Entscheidend für die Frage der *Spezifität* der in unseren Versuchen erzielten Festigkeit konnten daher nur *Tierversuche* sein.

Tab. 1 zeigt das Verhalten des gegen Parafuchsin gefestigten (und auch tryparosanfesten) Stammes gegenüber je einem Vertreter ganz verschiedenartiger Gruppen von Chemikalien.

Tabelle 1. *Verhalten des parafuchsinfesten Stammes.*

Substanz	Dosis	Resultat
Trypaflavin	1 : 1000	wirksam
	1 : 5000	unwirksam
Salvarsan	1 : 1000	wirksam
	1 : 3000	„
Brechweinstein	0,3—0,4 1 : 2000	„
Bayer 205	1 : 10 000	„
Parafuchsin	1 : 500	unwirksam
Tryparosan	1 : 100	„

Die Behandlung des parafuchsinfesten Stammes mit Trypaflavin 1 : 1000 subcutan erzielt im Heilversuch bei schwach angegangener Infektion dauernde Befreiung von Trypanosomen, während die mit Trypaflavin 1 : 5000 behandelten Tiere der Infektion erliegen, welch letztere Dosis sich aber auch bei dem Normalstamm als unwirksam erwiesen hat. Bei gleichartiger Einwirkung von Salvarsan auf den Parafuchsinstamm ergibt nicht nur die einmalige Gabe von 0,5 ccm einer Verdünnung 1 : 1000, sondern auch von 1 : 3000 rezidivfreie Heilung; der Stamm verhält sich also dem Salvarsan gegenüber wie ein Normalstamm. Von Brechweinstein und Bayer 205 führen die auch beim Normalstamm wirksamen Minimaldosen zur Heilung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, *daß der parafuchsinfeste Stamm einen ausgeprägt spezifischen Charakter seiner Festigung besitzt*, indem die Unempfindlichkeit sich nur auf das Parafuchsin bzw. dessen chloriertes Derivat, das stärker wirksame Tryparosan erstreckt. In Übereinstimmung mit den Versuchen *Ehrlichs* ist die Empfindlichkeit gegenüber trypanoziden Arsenikalien und Akridinverbindungen normal.

Interessant ist das Verhalten gegenüber 2 weiteren Triphenylmethanfarbstoffen, denen gleichfalls eine gewisse trypanozide Wirkung zukommt, dem Methylviolett und dem Brillantgrün (ein äthylierter bzw. methylierter Triphenylmethanfarbstoff). Allerdings handelt es sich hier um relativ giftige Körper von geringer Wirksamkeit; diese Eigenschaften der genannten Substanzen sind von *Weber* und *Krause*[8]) sowie *Wendelstadt* und *Fellmer*[9]) beschrieben worden.

Brillantgrün in Konzentrationen von 1 : 200 bzw. 1 : 500 (0,3 ccm) führte bei unserem Normalstamm nur zu einer vorübergehenden Verminderung der Trypanosomen im peripheren Blute. Von 4 Tieren erlagen 3 der Infektion am 7. Tage. Nur bei einer Maus waren vorübergehend gar keine Trypanosomen zu finden, sie erlag erst am 12. Tage dem Rezidiv. Auffallenderweise war diese Maus gerade mit der schwächsten Dosis (0,3 ccm 1 : 500) behandelt worden.

Zu dem parallel geführten Versuch mit dem parafuchsinfesten Stamm wandten wir eine etwas stärkere Dosis (auf 20 g Maus 0,5 ccm) der gleichen Verdünnungen

des Brillantgrüns an. Hier starben 3 Mäuse an der Vergiftung, die Trypanosomen waren nicht geschwunden, während wieder bei einer mit 1 : 500 behandelten Maus die Infektion ganz schwach verlief, indem 4 Tage nach der Infektion nur wenige Trypanosomen im Gesichtsfeld waren. Am 8. bis 11. Tage war das Tier trypanosomenfrei und erlag am 13. Tage einem Rezidiv. Soweit diese schwach wirksame Substanz überhaupt Vergleiche erlaubt, verhält sich also der parafuchsinfeste Stamm dem Brillantgrün gegenüber nicht wesentlich anders als der Normalstamm.

Ein gleichartig mit Pyoktanin durchgeführter Versuch sei tabellarisch wiedergegeben.

Tabelle 2. *Vergleich der Wirkung von Pyoktanin auf den normalen und parafuchsinfesten Stamm Nagana Prowazek.*

Maus Nr.	1.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	11.	13.	14.	15. Tag
		Bef. u. Behandl.	Bef.	Bef.u.Behandl.	Bef. u. Behandl.	Bef.	Bef.	Bef.	Befund	Bef.	Bef.	Befund
1	Subcutan	+ 0,3 1:200	+ +	+ –	†							
2	infiziert	+(+) 0,3 1:200	+	† –	–							
3	mit Nor-	(+) 0,3 1:500	+ +	† –	–							
4	malstamm	+ 0,3 1:500	+	+ + + –	†							
5	Subc. in-	– –	–	0 –	(+) 0,5 1:200	+ +	0	–	0	–	+	† - - -
6	fiziert mit	– –	–	0 –	+ + + 0,5 1:200	+ + +	0	–	((+))	+ + +	†	-
7	parafuch-	– –	–	(+) 0,5 1:500	((+)) –	+ +	+ +	†	–	–	–	-
8	sinfestem	– –	–	(+) 0,5 1:500	+ + –	+ + +	†	–	–	–	–	-
9	Stamm	– –	–	(+) 0,5 1:500	+ + –	+ +	+ +	+ + +	†	–	–	-

Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, starben alle 4 mit dem normalen Trypanosomenstamm infizierten Tiere, die bei relativ schwach angegangener Infektion Pyoktanin erhalten hatten, am 5.—6. Tage nach der Infektion. Ebenso gingen auch die mit 0,5 ccm Pyoktanin 1 : 500 behandelten Tiere, auf die der parafuchsinfeste Stamm verimpft worden war, 3—5 Tage nach der Behandlung an der fortschreitenden Infektion zugrunde.

Ganz anders verhielten sich aber die beiden mit Pyoktanin 1 : 200 bei etwas größerer Dosis (0,5/20 g) behandelten Mäuse der parafuchsinfesten Serie; es sind zwar am Tage nach der Behandlung, das ist der 7. Tag nach der Infektion, noch immer Trypanosomen im Blut zu finden, bei der einen (Maus 5) ist sogar ein gewisses Fortschreiten der Infektion zu konstatieren. Aber am 8.—11. Tag sind sie trypanosomenfrei (bzw. die eine Maus — 6 — am 11. Tag nur ganz schwach infiziert). Erst am 14. Tag erliegt die eine Maus dem Rezidiv, während die andere am gleichen Tag nur eine schwache Infektion erkennen läßt und der Tod am Rezidiv erst tags darauf eintritt.

Es mag auffallend erscheinen, daß die Festigkeit des parafuchsinfesten Stammes voll auf das stärker wirksame Tryparosan übergriff, während die doch wesentlich schlechter wirksamen Verbindungen Brillantgrün und Pyoktanin noch immer die für sie charakteristische schwache

Wirkung auf den Stamm besaßen. Ein Analogon bietet das von *Schnitzer*[10]) erwähnte Verhalten des *Stibosans*. Dies ist eine Antimonverbindung von extrem langsamer trypanozider Wirkung, die als einzige Antimonverbindung die Fähigkeit besaß, einen brechweinsteinfesten Trypanosomenstamm zu beeinflussen. Danach muß der Wirkungsmechanismus dieser und wohl auch anderer sehr langsam wirkender Mittel ein anderer sein als derjenige der rascher wirkenden. Auch Pyoktanin und Brillantgrün führen, wenn sie überhaupt wirksam sind, ein sehr langsames Verschwinden der Trypanosomen herbei. Diesem Stadium geht sogar vielfach eine vorübergehende Vermehrung der Parasiten voraus. Über den Wirkungsmechanismus als solchen läßt sich zur Zeit noch nichts aussagen. Die oben mitgeteilten Versuche legen aber die Vermutung nahe, daß hier Verhältnisse vorliegen, zu deren Deutung weder die grob-chemische Konstitution der Verbindungen noch die Chemozeptorentheorie ohne weiteres ganz ausreichen; mit ihrer experimentellen Bearbeitung sind wir beschäftigt.

Zusammenfassung.

1. Ein gegen Parafuchsin experimentell gefestigter Trypanosomenstamm (Nagana Prowazek) ist gegen diesen Farbstoff sowohl bei subcutaner wie bei peroraler Darreichung in vivo maximal unempfindlich. In vitro verhält sich der Stamm wie ein Normalstamm.

2. Die Festigkeit ist spezifisch: Salvarsan, Trypaflavin, Brechweinstein und Bayer 205 wirken auf die parafuchsinfesten Trypanosomen wie auf die des normalen Stammes.

3. Die erzielte Parafuchsinfestigkeit erstreckt sich im Gegensatz zu dem von *Rœhl* beschriebenen Stamm auch auf das stärker wirksame *Tryparosan* (chloriertes Parafuchsin). Dagegen kommt die schwache trypanozide Wirkung zweier äthylierter bzw. methylierter Triphenylmethanfarbstoffe (Brillantgrün, Pyoktanin) auch gegenüber dem festen Stamm noch zur Geltung.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Ehrlich*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Ref. Beiheft S. 94. 1911 — [2]) *Neven*, Inaug.-Diss. Gießen 1909. — [3]) *Rœhl*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **1**, 70. 1908. — [4]) *Marks*, Arb. a. d. Kgl. Inst. f. exp. Therapie 1908, Heft 4, S. 31. — [5]) *Morgenroth* und *Freund*, Klin. Wochenschr. **3**, Nr. 2. 1924. — [6]) *Voegtlin, Dyer* und *Miller*, Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. **23**, 55. 1924. — [7]) *Collier*, Arb. a. d. Georg-Speyer-Haus 1924, Heft 17, S. 26. — [8]) *Weber* und *Krause*, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 7, S. 192. — [9]) *Wendelstadt* und *Fellmer*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **52**, 263. 1906. — [10]) *Schnitzer*, Dtsch. med. Wochenschr. **52**, 63. 1926.

Über die dringende Notwendigkeit einer Neuregelung der Milchpasteurisierung in Deutschland.

Von

Dr. phil. **K. Richter** und Dr. med. vet. **M. Seelemann**,

Wissenschaftliche Hilfsarbeiter im Bakteriologischen Institut der Preuß. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel.

Mit 3 Textabbildungen.

A. Hochpasteurisierung.

Neuere Untersuchungen in Deutschland haben ergeben, daß die gesetzlich geforderte Hochpasteurisierung der Sammelmilch in der Form, in der sie praktisch allgemein durchgeführt wird, nicht den Zweck erreicht, den sie wohl nach den Ausführungsbestimmungen zum Reichsviehseuchengesetz erfüllen soll. Diese Bestimmungen (§ 28 B.A.V.G.) fordern für die Erhitzung von Milch für Tierfütterungszwecke die Anwendung eines der folgenden Erhitzungsverfahren: a) Erhitzung über offenem Feuer bis zum wiederholten Aufkochen; b) Erhitzung durch unmittelbar oder mittelbar einwirkenden strömenden Wasserdampf auf 85° C; c) Erhitzung im Wasserbad auf 85° C für die Dauer einer Minute. In Ausnahmefällen kann der Regierungspräsident die Erhitzung auf 70° C während einer halben Stunde zulassen, wenn die Durchführung dieses Erhitzungsverfahrens gewährleistet erscheint.

Von den 3 Verfahren kommt in der Praxis fast nur noch die Anwendung von mittelbar einwirkendem strömenden Wasserdampf in Frage. Diesem Zweck dienen die verschiedenen Typen der Hocherhitzer (Hocherhitzer „Astra" des Bergedorfer Eisenwerkes und die Hocherhitzer der Molkereimaschinenfabrik Ahlborn, Hildesheim), in denen eine Erhitzung der Sammelmilch entsprechend den Bestimmungen des Viehseuchengesetzes erfolgen soll. Für die Kontrolle einer angeblich ausreichenden Erhitzung soll die Guajakreaktion Gewähr bieten.

Bei näherer Betrachtung zeigen die 3 obengenannten Erhitzungsarten Unstimmigkeiten, die auf eine nicht eindeutige Fassung der Vorschriften im Gesetz für das unter b) angeführte Verfahren zurückzuführen sind. Hier schreibt der Gesetzgeber nur das Erreichen einer Endtemperatur von 85° C vor, ohne genaue Vorschriften bezüglich der Erhitzungsdauer auf diese Temperatur zu geben. Sinngemäß muß jedoch angenommen werden, daß von seiten des Gesetzgebers eine gewisse Zeitdauer der Einwirkung dieser Temperatur beabsichtigt war. Dies läßt sich aus den Vorschriften für die Erhitzungsverfahren unter a) und c) schließen.

Die unter a) genannte Vorschrift verlangt „Erhitzung über offenem Feuer *bis zum wiederholten Aufkochen*", d. h. der Gesetzgeber hält die momentane Einwirkung von 100° C *noch nicht* für ausreichend. Ebenso wird bei dem Erhitzungsverfahren unter c) die *Einwirkung einer Temperatur von 85° C für die Dauer 1 Minute* gefordert.

Während im Gesetz selbst für das Verfahren unter b) keine besonderen Angaben über die Zeitdauer gemacht sind, geht aus dem Obergutachten des Landesveterinäramtes vom 23. XII. 1924 eindeutig hervor, daß „die Erhitzung der Milch im Großbetrieb auf 85° C *während 1 Minute das Mindestmaß dessen ist, was für die Hochpasteurisierung der Milch im kontinuierlichen Betriebe* **unbedingt** *verlangt werden muß*". Diese Auffassung ist zurückzuführen auf die im Jahre 1902 veröffentlichten Versuche von *Tjaden, Koske* und *Hertel*[1]) aus dem Reichsgesundheitsamt. Es ist demnach nicht recht ersichtlich, weshalb in dem § 28 der BAVG., Abs. 3b keine Angaben über die Erhitzungsdauer gemacht worden sind. Die Annahme, daß in den im Obergutachten des Landesveterinäramtes genannten Apparaten (Bergedorf, Ahlborn usw.) eine Erhitzung während mindestens 1 Minute unter praktischen Verhältnissen stattfindet, hat sich bis auf den heutigen Tag erhalten.

Nach den von uns im Bakteriologischen Institut der Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel 1925/26 durchgeführten Versuchen mit neuzeitlichen Hocherhitzungsanlagen (BergedorferPasteur U 1 und U 6, Hocherhitzer Ahlborn Art. 121 und Klaus Hocherhitzer) *ist diese Annahme als irrig zu bezeichnen.*

Den Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen bildeten folgende Beobachtungen: 1. die Feststellung, daß Tuberkelbacillen in 2 Versuchen[2]) bei Erhitzung auf 85° C im Hocherhitzer Bergedorf U 6 nicht restlos abgetötet wurden (Meerschweinchenimpfung); 2. die Feststellung[3]), daß bei einem nach dem kontinuierlichen System arbeitenden Dauerheißhalter (Hako) die mittlere Durchflußzeit nicht der tatsächlichen Aufenthaltsdauer jedes einzelnen Milchteilchens im Apparat entspricht, sondern daß durch Strömungsverschiebungen sich für die einzelnen zufließenden Milchteile sehr verschiedene Aufenthaltsdauern im Apparat ergeben; 3. die Berechnung der *mittleren Durchflußzeit* aus Betriebsfüllung und Stundenleistung der Apparate, die bei Zugrundelegung der in den Katalogen angegebenen Werte für die Stundenleistung *nur 20—30 Sek.* beträgt; 4. die Feststellung, daß in einem Versuch (Bergedorfer Hocherhitzer U 1) mit Typhus- und Paratyphusbacillen infizierter Milch einzelne Keime am Leben blieben. Das gleiche wurde im Hocherhitzer U 6 in normaler Ausführung für Bact. coli festgestellt[4]).

Es besteht die Möglichkeit, eine mittlere Durchflußzeit von einer Minute bei den Apparaten zu erreichen, dadurch, daß sie nur mit etwa der halben von den Fabriken angegebenen Stundenleistung betrieben werden. Selbst unter diesen Bedingungen ist es jedoch verfehlt, die mittlere Durchflußzeit der tatsächlichen Erhitzungsdauer jedes einzelnen Milchteilchens gleichzusetzen, wie die Untersuchungen über die Strömungsverhältnisse gezeigt haben.

Die bei den Versuchen angewendete Methodik war folgende: Den Apparaten wurde im normalen Betrieb Magermilch zugeführt und die Temperatur möglichst genau auf 85° C eingestellt. Zu einem gegebenen Zeitpunkt wurde eine Umschaltung von Magermilch- auf Vollmilchzusatz vorgenommen, ohne daß eine Betriebsstockung eintrat. Nach Umschaltung wurden am Auslaufstutzen der Apparate

durch einen Probenahmehahn laufend Proben der ausfließenden Milch entnommen. Durch die Bestimmung des Fettgehaltes in diesen Proben war es möglich, das Mischungsverhältnis von Voll- und Magermilch zu berechnen und hieraus die Erhitzungsdauer der einzelnen Milchteilchen zu bestimmen. Diese Prüfungen wurden vorgenommen 1. im Hocherhitzer „Astra“ U 6 mit Stabrührwerk (Bergedorf), 2. im Hocherhitzer U 6 mit Ringscheibenrührwerk (Bergedorf), 3. im Hocherhitzer Art. 121, 4 mit Ringscheibenrührwerk (Ahlborn). Der unter 3. genannte Apparat unterscheidet sich durch die Form des Milchbehälters, die bei den Apparaten von Bergedorf zylindrisch ist, während bei dem Ahlbornschen Hochpasteur die Seitenwände die Begrenzungsflächen eines Paraboloidstumpfes darstellen.

Die Ergebnisse dieser Strömungsversuche sind aus den Tab. 1—3 und den graphischen Darstellungen (Abb. 1—3) zu ersehen. Es zeigt sich, daß bei dem Apparat unter 1 von einem gleichmäßigen Durchfluß keine Rede sein kann, da bereits im Intervall von 0—10 Sek. 4% der zulaufenden Milch wieder am Auslauf erscheinen, während die letzten Teile erst nach 280 Sek., also nach etwa der 5fachen mittleren Durchflußzeit, den Apparat verlassen. Günstiger stellen sich die Erhitzungszeiten bei den unter 2 und 3 genannten Apparaten, da hier das Vorauseilen und Zurückbleiben der Milchteilchen wesentlich eingeschränkt ist. Eine tatsächliche *Mindesterhitzungsdauer jedes einzelnen*

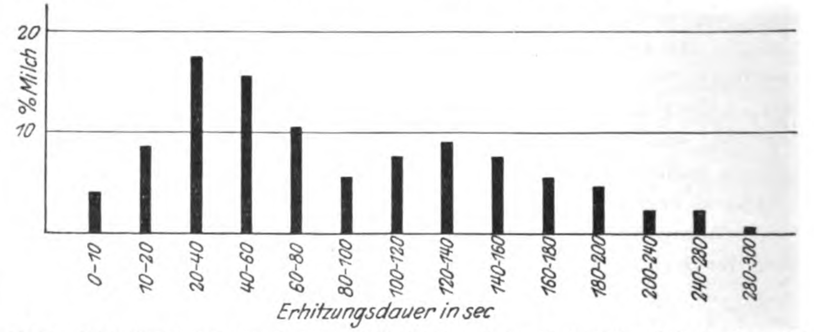


Abb. 1. Erhitzungsdauer der einzelnen Milchteilchen beim Hocherhitzer U 6 des Bergedorfer Eisenwerks.

Tabelle 1.
Durchflußzeit der einzelnen Milchteilchen bei Hocherhitzer U 6 mit Stabrührwerk.

Lfd. Nr.	Zeit in Sekunden	Milch in %	Lfd. Nr.	Zeit in Sekunden	Milch in %
1	0—10	4,0	9	140—160	7,5
2	10—20	8,5	10	160—180	5,5
3	20—40	17,5	11	180—200	4,5
4	40—60	15,5	12	200—220	1,0
5	60—80	10,5	13	220—240	1,0
6	80—100	5,5	14	240—260	1,0
7	100—120	7,5	15	260—280	1,0
8	120—140	9,0	16	280—300	0,5
			Gesamt	0—300	100,0

Milchteilchens von einer Minute läßt sich auch durch weitere Einschränkung der Stundenleistung nicht erreichen, sondern es muß stets ein Teil der Milch vorauseilen und ein Teil, länger als der mittleren Durchflußzeit entspricht, im Apparat zurückbleiben. Nicht berücksichtigt ist hierbei die Tatsache, daß die Durchflußzeit *nicht* mit der Erhitzungsdauer auf 85° C gleichgesetzt werden darf, sondern daß die Erhitzungsdauer wesentlich kürzer ist, da erst bei einer gewissen Aufenthaltszeit im Hocherhitzer die Milch die Temperatur von 85° C annimmt. Eine Bestimmung dieses Zeitraumes ließ sich nicht durchführen, da es infolge technischer Schwierigkeiten nicht möglich ist, hinreichend genaue Meßgeräte zu konstruieren.

Die obigen Ausführungen zeigen, daß die im Obergutachten angegebenen Bedingungen von *keinem* der Apparate erfüllt werden. Gleichzeitig mit den anderen Untersuchungen vorgenommene Prüfungen der auslaufenden Milch auf die Anwesenheit von Peroxydasen nach der Guajak- und Tillmansschen Reaktion ergaben Ausbleiben der Blaufärbung; es war also eine *anscheinend* ausreichende Erhitzung im Sinne des Viehseuchengesetzes erfolgt. Unsere Versuche haben aber ergeben, daß das Ausbleiben der Blaufärbung kein sicheres Zeichen für eine *restlose Abtötung pathogener Keime* (Tuberkel- und Typhusbakterien) ist, daß also an Stelle

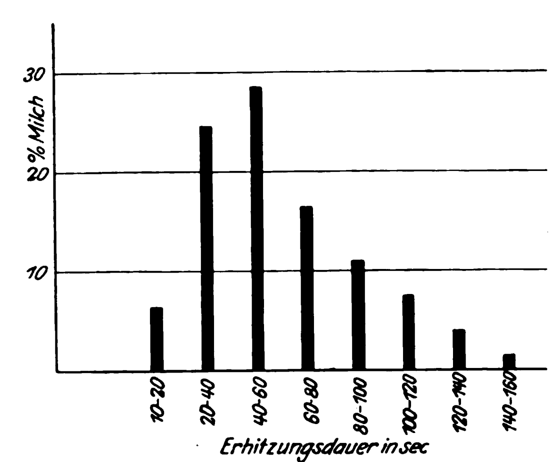


Abb. 2. Erhitzungsdauer der einzelnen Milchteilchen beim Hocherhitzer U 6 des Bergedorfer Eisenwerks mit Ringscheibenrührwerk.

Tabelle 2. *Durchflußzeit der einzelnen Milchteilchen bei Hocherhitzer U 6 mit Ringscheibenrührwerk.*

Lfd. Nr.	Zeit in Sekunden	% Milch bis zum Ende der Zeit	% Milch in der Zeitspanne
1	0—10	0	0
2	10—20	6,5	6,5
3	20—40	31,0	24,5
4	40—60	59,5	28,5
5	60—80	76,0	16,5
6	80—100	87,0	11,0
7	100—120	94,5	7,5
8	120—140	98,5	4,0
9	140—160	100,0	1,5

dieser Reaktion andere Maßnahmen ergriffen werden müssen, um eine ausreichende Erhitzung kontrollieren zu können. Als Ersatz wäre zu fordern: a) Zulassung von Apparaten zur Hocherhitzung nur nach genauer bakteriologischer Prüfung neben der maschinentechnischen, b) Anbringung von geprüften Registrierthermometern an sämtlichen Apparaten und Aufbewahrung der erzielten Diagramme für eine gewisse Zeit.

B. Dauerpasteurisierung.

Angesichts der oben erwähnten Tatsache erscheint es schwer verständlich, daß von gewisser Seite unter Verkennung der tatsächlichen Verhältnisse in schärfster Weise für die Hochpasteurisierung eingetreten wird unter gänzlicher Ablehnung der Dauerpasteurisierung. Es ist zu begrüßen, daß zur Entscheidung strittiger Pasteurisierungsfragen vom Preußischen Ministerium für Landwirtschaft, Domänen und Forsten Versuche angeordnet worden sind, und daß ebenso vom Reichsgesundheitsamt und den Bakteriologischen Instituten der Landwirtschaftskammern diesbezügliche Versuche in Angriff genommen

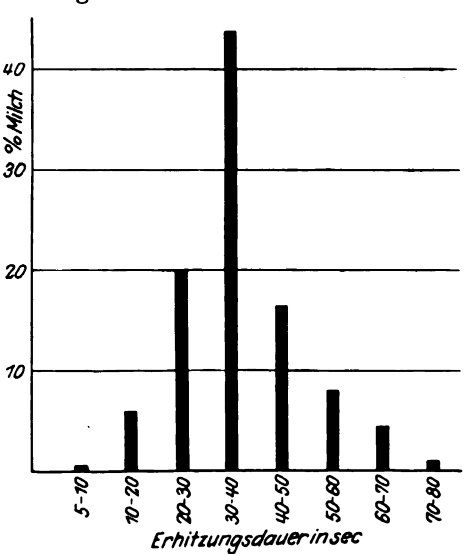


Abb. 8. Erhitzungsdauer der einzelnen Milchteilchen beim Hocherhitzer Art. 121 mit Ringscheibenrührwerk der Fa. Ahlborn, Hildesheim.

Tabelle 3. *Durchflußzeit der einzelnen Milchteilchen im Hocherhitzer Art. 121 der Firma Ahlborn.*

Lfd. Nr.	Zeit in Sekunden	% Milch bis zum Ende der Zeit	% Milch innerhalb der Zeitspanne
1	0—5	0	0
2	5—10	0,5	0,5
3	10—15	2,0	1,5
4	15—20	6,5	4,5
5	20—25	15,5	9,0
6	25—30	26,5	11,0
7	30—35	45,0	18,5
8	35—40	70,0	25.0
9	40—50	86,5	16.5
10	50—60	94,5	8.0
11	60—70	99,0	4.5
12	70—80	100,0	1,0

wurden. Man darf nicht verkennen, daß die Hocherhitzung die Milch sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung wie auch in geschmacklicher Richtung ungünstig beeinflußt, daß dagegen diese Erscheinungen überhaupt nicht oder nur in abgeschwächtem Maße bei der Dauererhitzung, d. h. *einer Erhitzung auf 63° C für die Dauer von 30 Min.*, auftreten. Die Frage ist nur, ob bei dieser Art der Erhitzung eine hinreichende Gewähr für die Abtötung pathogener Keime gegeben ist. Insbesondere gilt dieses für die Abtötung von Tuberkelbacillen und der Vertreter der Typhus-Paratyphusgruppe.

Über diese Frage liegen bereits von deutscher Seite eine Anzahl Untersuchungen vor, die in den Jahren 1925/26 ausgeführt wurden. Hierher gehören die Arbeiten von *Machens*[5]), *Pröscholdt*[6]) und *Seelemann*[2 u. 7]). Erfreulicherweise haben diese unter praktischen Bedingungen durchgeführten Versuche zu einem gleichlautenden Ergebnis geführt, das sich mit den Ergebnissen ausländischer, insbesondere amerikanischer Versuchsansteller[8]), deckt. Es wurde festgestellt, daß eine 30 Min. lange Erhitzung jedes einzelnen Milchteilchens auf die genannte Temperatur Gewähr dafür bietet, daß Tuberkelbacillen *sicher* abgetötet werden, und daß auch die Abtötung von Typhus- und Paratyphuskeimen eine so weitgehende ist — nur einige frisch reingezüchtete Stämme erwiesen sich anfangs in Laboratoriumsversuchen als hitzefester —, daß durch diese Art der Erhitzung in Zukunft die gefürchteten Epidemien auf ein Minimum herabgesetzt, wenn nicht vollständig vermieden werden. *Zu fordern ist allerdings, daß nur Apparate zugelassen werden, bei denen eine eingehende bakteriologische Prüfung stattgefunden hat, die sich auch darauf erstrecken muß, festzustellen, ob für jedes einzelne Milchteilchen die erforderliche Erhitzungsdauer von 30 Min. bei ordnungsgemäßem Betriebe sichergestellt ist.*

Prüfungen in der Kieler Forschungsanstalt haben ergeben, daß die Vierzellenheißhalter (Standwannensysteme) der Firmen Ahlborn-Hildesheim und Bergedorfer Eisenwerk diesen Anforderungen entsprechen[2]). Bei kontinuierlich arbeitenden Apparaten (*Durchflußwannen*) muß von Fall zu Fall untersucht werden, ob nicht ein Voreilen von Milchteilen innerhalb der Apparate stattfindet, wie es z. B. bei dem Dauerheißhalter „Hako" der Firma *Jünemann*-Oberscheden[3]) der Fall ist. Eine Nachprüfung der stattgehabten *ausreichenden* Erhitzung durch eine chemische Reaktion ist, wie auch bei der Hochpasteurisierung, nicht möglich. *An ihrer Stelle ist ebenso wie dort die Kontrolle durch registrierende Thermometer und häufigere Besichtigungen der Anlagen unter Prüfung der Temperaturdiagramme in den Molkereien zu fordern.*

C. Momenterhitzung.

In den letzten Jahren bricht sich neben der üblichen Hocherhitzung ein Verfahren Bahn, das als Momenterhitzung bezeichnet wird. Verwendung findet dabei der Hocherhitzer System „*Tödt*", der im Betriebe des Erfinders, des Meiereiinspektors *Tödt*-Lehnsahn und an anderen Stellen bereits längere Zeit zur Zufriedenheit arbeitet. Die Hauptunterschiede, die dieses System vor den üblichen Formen der Hocherhitzung kennzeichnen, sind folgende: 1. Die Milch wird mit einer Pumpe durch einen schmalen Spalt zwischen einer feststehenden äußeren und einer rotierenden inneren Heizfläche hindurchgedrückt. 2. Die Erhitzung der Milch erfolgt von zwei Seiten gegenüber einer nur einseitigen Erhitzung bei den unter A) erwähnten „Hochpasteuren". 3. Die mittlere Durchflußzeit beträgt beim normalen Betrieb nur etwa 11 Sek., so daß mit dem Apparat eine recht hohe Stundenleistung zu erreichen ist. Versuche, die mit diesem Apparat in Lensahn und Kiel durchgeführt wurden, ergaben, daß die Mindestdurchflußzeit 5—8 Sek. beträgt, und daß bereits nach etwa 3facher mittlerer Durchflußzeit die letzten Milchteilchen den Apparat verlassen. Die kürzest erhitzten Teile verbleiben also mindestens dieselbe Zeit im Apparat wie in Hochpasteuren mit Ringscheibenrührwerk. Für die Beurteilung der Abtötungswirkung ist hier jedoch zu berücksichtigen, daß die Erwärmung der Milch eine sehr viel günstigere ist, da die dünne Milchschicht von beiden Seiten erwärmt wird. Versuche mit dem Tödtschen Milchhocherhitzer ergaben, daß bei Betrieb des Apparates bei 85° C eine sichere Abtötung von Bact. coli stattfindet. Das gleiche Ergebnis zeitigte ein bei Erhitzung auf 85° C durchgeführter Versuch mit Tuberkelbacillen (Meerschweinchenimpfung).

D. Schlußfolgerungen.

Auf Grund unserer Untersuchungen lassen sich die nachstehenden Folgerungen ziehen:

1. *Die Hochpasteurisierung* und ihre Kontrolle durch die Peroxydasereaktion ist vom bakteriologischen Standpunkt als im allgemeinen nicht ausreichend zu bezeichnen.

2. Eine Mindesterhitzungsdauer von einer Minute wird von keinem der geprüften Apparate gewährleistet. *Sinngemäß müßte demnach die Anwendung dieser Apparate als nicht ausreichend für die Durchführung der Erhitzungsvorschriften des § 28 B.A.V.G. angesehen werden.*

3. Es wird sich als notwendig erweisen, daß für die einzelnen Erhitzungsapparate besondere Prüfungsbestimmungen erlassen werden, und daß nur Apparatetypen zur Erhitzung der Sammelmilch entsprechend den B.A.V.G. zugelassen werden, die diese Prüfungsbedingungen erfüllen.

4. Im Zusammenhang mit der Untersuchung über die Erhitzungsdauer der einzelnen Milchteilchen haben die Abtötungsversuche ergeben, daß sehr viel kürzere Zeiten ausreichen als 1 Min. 10 Sek. Mindesterhitzungsdauer gewährleisten bereits eine sichere Abtötung der Tuberkelbacillen im praktischen Betriebe (s. Momenterhitzer „Tödt").

5. Von den von uns untersuchten Apparaten entsprechen nur die Pasteure mit Ringscheibenrührwerk diesen Bedingungen, während Apparate mit Stabrührwerk abzulehnen sind.

6. Eine Sonderstellung nimmt der *Milchhocherhitzer „Tödt"* ein, da bei ihm eine besonders intensive Erhitzung infolge der dünnen Schicht (nur 8—10 mm) und der doppelseitigen Erwärmung erzielt wird.

7. Der im Obergutachten des Landesveterinäramtes bezüglich der *Dauerpasteurisierung* vertretene Standpunkt, daß eine 20 Min. lange Erhitzung auf 63° C zur Abtötung pathogener Mikroorganismen nicht ausreicht, besteht zu Recht. *Zu fordern ist eine 30 Min. lange Erhitzung auf 63° C für Sammelmilch*, bei der noch keine Veränderungen eintreten, die die molkereimäßige Verarbeitung der Milch beeinträchtigen.

8. Im Hinblick auf die mit der Dauerpasteurisierung erzielten Ergebnisse wäre eine baldige Anerkennung derselben als ausreichende Erhitzungsart im Sinne des B. A. V.G. zu wünschen, da bei ihr eine mindestens ebenso sichere Abtötung der Keime erfolgt wie bei der Hocherhitzung.

9. Eine Kontrolle der ausreichenden Erhitzung bei der Dauerpasteurisierung müßte in derselben Weise ausgeübt werden wie bei der Hocherhitzung (Prüfung der Apparate vor ihrer Zulassung).

10. Die Anwendungsgebiete liegen für die Hocherhitzung bzw. Momenterhitzung in der Möglichkeit, große Milchmengen innerhalb kürzester Zeit bei beschränkten Platzverhältnissen zu verarbeiten, während die Dauerpasteurisierung geeignet erscheint, für menschlichen Konsum bestimmte hochwertige Molkereierzeugnisse (Trinkmilch, Flaschenmilch, Rahm) herzustellen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Tjaden, Koske* und *Hertel*, Zur Frage der Erhitzung von Milch mit besonderer Berücksichtigung der Molkereien. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt **18**. 1902. — [2]) *Seelemann*, Vergleichende Untersuchungen über die Abtötung von Tuberkelbacillen in der Milch mit Hilfe neuzeitlicher Dauer- und Hocherhitzungsanlagen. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **36**, Heft 8, 9 u. 10. 1926. — [3]) Prüfung des Dauerheißhalters „Hako" der Fa. Jünemann & Co., Oberscheden. Erstattet vom Bakteriologischen und Machinentechnischen Institut der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel. Milchwirtschaftl. Forsch. 1926, Heft 2/3. — [4]) *Richter*,

Untersuchungen über die Strömungsverhältnisse in Rührwerkspasteuren und die Einwirkung derselben auf die Abtötung schädlicher Mikroorganismen. Molk.-Ztg. Hildesheim 1926, Nr. 39/40. — [5]) *Machens*, Genügt die Dauererhitzung der Milch auf 63° C zur Abtötung der in ihr enthaltenen Tuberkelbacillen? Molk.-Ztg. Hildesheim **39**, Nr. 42 und **40**, Nr. 18, 20 und 41. — [6]) *Pröscholdt*, Versuche über die Dauererhitzung der Milch bei 60—65° C in Standwannen mit Rührwerk in mehreren Molkereien Pommerns. Tierärztl. Rundschau 1925, Nr. 42 und 43. — [7]) *Seelemann*, Über die Widerstandskraft der Bakterien der Typhus-Paratyphusgruppe in dauererhitzter Milch. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **36**, Nr. 16. 1926.— [8]) Bericht des amerikanischen Gesundheitsamtes, veröffentlicht als Public Health Bulletin Nr. 147, „Commercial Pasteurization".

(Aus dem Bakteriologischen Institut an der I. Moskauer Staats-Universität.
Direktor: Prof. *W. Barikin.*)

Zur Frage der Beziehungen der herpetischen Infektion zur Encephalitis.

Von
Dr. S. **Dmitrieff.**

Bei unseren Versuchen sind wir auf die interessante Tatsache gestoßen, daß das herpetische Virus, wenn es durch das Gehirn des Meerschweinchens geht, bedeutend schwächer virulent wird. Im allgemeinen gehört das Meerschweinchen, sowie das Kaninchen und die Maus, zu den in bezug auf das herpeto-encephalitische Virus leicht empfänglichen Tieren und die Passagen durch dasselbe gelingen ebenso wie die Passagen von ihm aus zum Kaninchen. Jedoch bemerken einige Autoren, welche mit den Stämmen der Encephalitis gearbeitet haben, daß das Virus bei den Passagen durch das Meerschweinchen schwächer wird (*Levaditi* und *Harvier*, *Belikoff* und *Rasumoff*). Bei den letzteren Autoren ist die Infektion von den Meerschweinchen der 6. Passage nicht mehr angegangen. Bei unseren Versuchen beobachteten wir von den ersten Passagen an eine Schwächung des Virus, während das herpetische Virus, mit welchem wir experimentierten, schon seit $1^1/_2$ Jahren für Kaninchen in hohem Grade virulent blieb, so daß es bei subduraler Impfung nach einer kurzen Inkubationsperiode von 4—6 Tagen (seltener von 3 Tagen) immer tötete.

Die Resultate unserer Versuche sind in folgenden Protokollen angegeben:

Versuch 1. Dem Meerschweinchen A_1 wurden subdural 0,2 ccm der Gehirnemulsion des Kaninchens Nr. 54 eingeimpft (8. Passage durch Kaninchen). Vom 7. Tage an zeigen sich beim Meerschweinchen Symptome der Encephalitis: Tremor, allgemeine Schwäche, Parese. Das Meerschweinchen stirbt am 11. Tage. Histologisch: Auf dem Gebiete der Halbkugeln reiche Infiltration durch lymphoidische Elemente, perivasculäre Hüllen aus denselben lymphoiden Elementen, welche mehrere Gefäße umfassen.

Die Gehirnemulsion des Meerschweinchens A_1 wurde subdural dem Kaninchen Nr. 61 und den Meerschweinchen A_2 und A_3 eingeimpft. Alle 3 Tiere blieben ohne jegliche Symptome am Leben. Kaninchen Nr. 61 am 50. Tage nach der Impfung chloroformiert war. Histologisch: Auf dem Gebiete der Halbkugeln stellenweise schwach entwickelte perivasculäre Hüllen und kleine Ansammlungen lymphoider Elemente, welche spärlich in der Substanz des Gehirns zerstreut sind.

Versuch 2. Dem Meerschweinchen B_1 wurde subdural 0,2 ccm der Gehirnemulsion des Kaninchens Nr. 57 eingeimpft (9. Passage durch das Kaninchen). Am 8. Tage Symptome der Encephalitis: Tremor, allgemeine Depression, Parese. Gestorben am 10. Tage. Histologisch: Meningitis aus Lymphocyten, schwache Infiltration der Gehirnrinde, ebenfalls mit Lymphocyten, Hämorrhagie in der weißen Substanz unter der Rinde, weit voneinander verstreute, schwach ausgeprägte perivasculäre Hüllen.

Die Gehirnemulsion des Meerschweinchens B_1 wurde den Meerschweinchen B_2 und B_3 und den Kaninchen Nr. 65 und 66 eingeimpft. Alle 4 Tiere blieben am Leben, ohne irgendwelche Symptome aufzuweisen. Die Meerschweinchen B_2 und B_3 wurden am 33. Tage nach der Impfung chloroformiert. Histologisch waren am Gehirn keinerlei Erkrankungen zu bemerken. Die Gehirnemulsion des Meerschweinchens B_1 wurde ferner dem Kaninchen Nr. 71 in die scarifizierte Hornhaut eingeimpft. Es entstand keine Keratitis.

Das Kaninchen Nr. 65 war auf die Immunität geprüft. Am 46. Tage nach der 1. Impfung wurden ihm subdural 0,2 ccm der Gehirnemulsion des Kaninchens Nr. 62 eingeführt (10. Passage durch Kaninchen). Das Kaninchen starb am 5. Tage, gleichzeitig mit dem Kontrolltier.

Versuch 3. Dem Meerschweinchen C wurden subdural 0,2 ccm Gehirnemulsion des Kaninchens Nr. 64 eingeimpft (11. Passage durch das Kaninchen). Am 9. Tage nach der Impfung zeigten sich beim Meerschweinchen die charakteristischen Symptome der Gehirnkrankheit: Rechtsseitige Hemiplegie, das Meerschweinchen fällt auf die Seite und auf den Rücken. Die Symptome halten 3 Wochen lang an, dann fängt das Meerschweinchen an, sich allmählich zu erholen, kann aber noch lange Zeit den Kopf nicht in vertikaler Richtung halten. Nach ungefähr 2 Monaten verschwindet auch dieses Symptom.

Versuch 4. Dem Meerschweinchen E wurden subdural 0,2 ccm Gehirnemulsion vom Kaninchen Nr. 62 eingeimpft (10. Passage durch das Kaninchen). Es blieb am Leben, ohne irgendwelche Symptome aufzuweisen.

Von 4 Meerschweinchen A_1, B_1, C und E, welche subdural mit dem passierten Virus vom Kaninchen geimpft wurden, starben also 2 unter deutlichen Symptomen von Encephalitis, wobei die entsprechenden histologischen Veränderungen im Gehirn festgestellt wurden; ein Meerschweinchen (C) überstand eine deutlich ausgeprägte Gehirnkrankheit, von welcher es sich erholte, und eines (das Meerschweinchen E) erwies sich als völlig unempfänglich für die Infektion. Wenn wir nun hinzufügen, daß die Meerschweinchen A_1 und B_1 ganz junge Tiere waren, die beiden anderen aber, das eine erwachsen (Meerschweinchen C) und das andere alt war (Meerschweinchen E), so können wir bei den Meerschweinchen einen gewissen Unterschied in der Empfänglichkeit im Zusammenhang mit dem Alter der Tiere annehmen. In der folgenden Passage vom Meerschweinchen zum Meerschweinchen läßt sich ein ausgesprochenes Sinken der Empfänglichkeit bis zu ihrem völligen Verschwinden beobachten, das sich auch auf die jungen Tiere erstreckt. (Alle Meerschweinchen der 2. Passage waren junge Tiere.) Der Durchgang des Virus durch das Gehirn des Meerschweinchens macht es nicht nur in bezug auf das Meerschweinchen, sondern auch in bezug auf das Kaninchen schwächer virulent.

Die corneale Impfung mit der Gehirnemulsion eines an Encephalitis umgekommenen Meerschweinchens erweist sich beim Kaninchen als vollständig resultatlos. Auf diese Weise verschwinden beim Durchgehen durch das Gehirn des Meerschweinchens die keratogenen Eigenschaften des Virus vollständig, während seine encephalitogenen Eigenschaften stark sinken (bis zu ihrer völligen Vernichtung in bezug auf das Meerschweinchen).

Im Zusammenhange mit dem Erwähnten schien es uns von Interesse zu erproben, ob nicht das Durchgehen des Virus durch die Hornhaut des Meerschweinchens einen Einfluß auf ihn hat. Wir machten daraufhin den entsprechenden Versuch.

Versuch 5. Dem Meerschweinchen F wurde in die scarifizierte Hornhaut die Gehirnemulsion des Kaninchens Nr. 68 eingerieben (Kaninchen Nr. 68 war am 11. Tage nach der cornealen Ansteckung an Encephalitis gestorben). Beim Meerschweinchen entsteht scharf ausgeprägte Keratitis und eitrige Conjunctivitis, wodurch das Verkleben der Augenlider hervorgerufen wird. Am 4. Tage nach der Erkrankung wurde Material von der Hornhaut abgeschabt und auf die Hornhaut des Kaninchens Nr. 74 verimpft. Das Kaninchen bekam Keratitis und eitrige Conjunctivitis und starb unter Erscheinungen von Encephalitis am 8. Tage nach der Impfung.

Aus diesem Versuche sehen wir, daß das Virus beim Durchgehen durch die Hornhaut des Meerschweinchens seine keratogenen und encephalitogenen Eigenschaften vollständig beibehält.

Einen abschwächenden Einfluß auf das Virus hat nur das Gewebe des Nervensystems eines wenig empfänglichen Tieres, wodurch seine Eigenschaften stark modifiziert werden bis zur völligen Vernichtung seiner Virulenz. Wenn wir uns auf den Standpunkt der Anhänger der unitaren Lehre stellen, so können diese Ergebnisse, welche wir an Meerschweinchen erhalten haben, einiges Licht auf die Beziehungen werfen, welche beim Menschen zwischen der herpetischen Infektion und der Encephalitis bestehen. Der Mensch ist sehr stark empfänglich für den Herpes, doch sind besondere Umstände erforderlich, welche wahrscheinlich nicht oft eintreten (z. B. während starker Influenzaepidemien, worauf die epidemiologischen Beobachtungen schließen lassen), damit die neurotropen Eigenschaften des Virus den Widerstand seines im allgemeinen nicht empfänglichen Nervensystems überwinden. Wenn das geschehen ist, so erkrankt er an Encephalitis. Doch beim Durchgehen durch sein Nervensystem verliert das Virus in hohem Grade seine Virulenz sogar für ein so stark empfängliches Tier, wie das Kaninchen. So würden sich die Schwierigkeiten bei der ersten Übertragung des Virus auf Kaninchen erklären.

Die dargelegten Erwägungen entsprechen den Ansichten *Levaditis,* welcher die Virulenz des Erregers und die Beschaffenheit des Nährbodens, auf welchen er fällt, als Hauptbedingungen zum Entstehen der Economo-

Krankheit hinstellt (*Levaditi, Nicolau* und *Poincloux*). In einem Falle erwies sich das Gehirn des Affen (Macaccus cynomolgus), welcher an Encephalitis zugrunde gegangen war, als nicht virulent dem Kaninchen (*Levaditi* und *Nicolau*). Hierin sieht *Levaditi* eine Analogie mit dem Verhalten des Virus im menschlichen Organismus.

Zusammenfassung.

1. Für einen Stamm des herpetischen Virus, der für Kaninchen stark virulent war, erwies sich das Meerschweinchen wenig empfindlich.

2. Nach dem Durchgang durch das Gehirn von Meerschweinchen erzeugte das Virus bei Kaninchen keine Keratitis mehr und nur zuweilen schwache Encephalitis. Der positive Erfolg der Impfung erwies sich nur in schwach ausgeprägten histologischen Veränderungen. Die Meerschweinchen der zweiten Passage erkrankten nicht mehr.

3. Der Durchgang des Virus durch die Hornhaut des Meerschweinchens zeigte dagegen keinen Einfluß auf seine keratogenen und encephalitogenen Eigenschaften.

4. Hält man an der Ansicht der Identität des herpetischen Virus mit dem encephalitischen fest, so vermögen die Befunde vielleicht eine Erklärung für die Schwierigkeiten der Überimpfung der Encephalitis vom Menschen zum Tiere zu geben.

Nachtrag bei der Korrektur: Inzwischen ist mir eine ausführliche Arbeit von *Rose* und *Walthard*, Versuche über Herpesinfektion usw., diese Zeitschrift **105**, S. 645, zur Kenntnis gekommen, die zu ähnlichen Ergebnissen führt. *R.* und *W.* zeigen in ihrer Arbeit, daß die Widerstandsfähigkeit des Meerschweinchengehirnes gegen eine Herpesinfektion wesentlich größer ist, als früher angenommen wurde (l. c. S. 646—48) und weiterhin, daß sich im Gehirn von Meerschweinchen, die an einer plantogenen Herpesencephalitis zu Grunde gegangen waren, das Herpesvirus nicht mit Regelmäßigkeit nachweisen läßt (S. 670). Auch haben sie den sich aus diesen Verhältnissen ergebenden Vergleich mit der Schwierigkeit des Virusnachweises bei der *von Economo*schen Encephalitis unter Bezugnahme auf die *Doerr*sche Encephalitis-Herpes-Hypothese bereits gezogen (S. 670/71 und 676). Auf Versuchsergebnisse von *Rose* an Kaninchen, die in der gleichen Linie liegen, hat auch *Doerr* schon 1925 in seinem Referat auf der Frankfurter Mikrobiologenversammlung hingewiesen.

Aus dem Obigen ist zu ersehen, daß die von uns gewonnenen Resultate keineswegs gesondert dastehen und daß die Eigenschaft des Virus, im Gehirn des Meerschweinchens eine Schwächung seiner Virulenz zu erleiden, nicht nur dem von uns untersuchten Stamme eigen, sondern anscheinend allen herptischen Vira verschiedenen Ursprungs gemeinsam ist.

Literaturverzeichnis.

Doerr und *Zdansky*, Kritisches und Experimentelles zur ätiologischen Erforschung des Herpes febrilis und Encephalitis lethargica. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **102**. 1924. — *Levaditi* et *Harvier*, Etude expérimentale de l'encéphalite, dite léthargique. Ann. de l'inst. Pasteur **34**. 1920. — *Levaditi* et *Nicolau*, L'étiologie de l'encéphalite épidémique. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **90**., 1372. 1924. — *Levaditi*, *Nicolau* et *Poincloux*, La virulence des gèrmes herpético-encéphaliques. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **90**., 1376. 1924. — *Belikoff* und *Rasumoff*, Über die Frage von dem Erreger der epidemischen Encephalitis. Klin. Med. 1925, Nr. 1—2 (russisch).

(Aus dem Staatlichen Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *W. Kolle.*)

Über experimentelle Recurrensinfektion des Kaninchens.

Von
Dr. R. Prigge,
Assistent am Institut.

Mit 1 Textabbildung.

Als besonders geeignete Versuchstiere für die experimentelle Infektion mit der Recurrensspirochäte des Menschen gelten Mäuse und Ratten, außerdem Affen, und zwar vor allem Makaken und andere Schmalnasen. Auch auf Hunde, Meerschweinchen und Kaninchen konnte die Recurrensinfektion gelegentlich übertragen werden[1, 2]). Kaninchen liefern zwar nach Vorbehandlung mit Recurrensspirochäten ein hochwirksames Immunserum, die Infektionserreger vermehren sich jedoch bei dieser Tierart im allgemeinen nur schwach und kurze Zeit. Nach *Breinl* und *Kinghorn*[3]) verläuft die Infektion von Kaninchen mit kleinen Mengen spirochätenhaltigen *Menschenblutes* (Sp. Duttoni) ergebnislos, dagegen bewirkt die Injektion großer Mengen (20 ccm) eine meist tödlich verlaufende Erkrankung. Eine Übertragung der Spirochäten von Tier zu Tier in fortlaufenden Passagen ist jeoch beim Kaninchen bisher nicht gelungen.

Demgegenüber kann festgestellt werden, daß es unter geeigneten Versuchsbedingungen sehr wohl möglich ist, auch beim Kaninchen ziemlich regelmäßig eine Infektion mit Recurrensspirochäten zu erzeugen und in Passagen weiter zu übertragen. Zu den Versuchen dienten vier im hiesigen Institut auf Mäusen fortgezüchtete Laboratoriumsstämme: zwei Stämme von russischer Recurrens, ein afrikanischer und ein sog. „salvarsanfester" afrikanischer Recurrensstamm. Die drei erstgenannten Stämme riefen zwar bei einem kleinen Teil der Tiere eine charakteristische Erkrankung hervor, versagten aber bei der überwiegenden Mehrzahl der Kaninchen, offenbar weil sie höhere Resistenz besaßen: bei solchen Tieren konnten die Spirochäten zwar gelegentlich noch einige Tage nach der Infektion durch Verimpfung von Blut auf Mäuse nachgewiesen werden; die Infektion verlief jedoch symptomlos. Dagegen gelang es mit dem *„salvarsanfesten" afrikanischen Recurrensstamm* durch *intravenöse Einspritzung regelmäßig*, durch *intra-*

testikuläre Injektion in der Mehrzahl der Fälle eine auch klinisch sich manifestierende, bei einem Teil der Tiere tödlich verlaufende Krankheit beim Kaninchen mit massenhafter Vermehrung der Spirochäten zu erzeugen, wenn zur Infektion genügend *große Mengen spirochätenhaltigen Mäuseblutes* verwandt wurden (2—5 ccm). Zu diesem Zweck wurden jeweils mehrere Mäuse dekapitiert, ihr Blut in einigen Kubikzentimetern physiologischer Kochsalzlösung aufgefangen und vor Eintritt von Gerinnung rasch injiziert.

Die Erkrankung des Kaninchens verläuft — insbesondere nach *intravenöser Infektion* — folgendermaßen: Kurze Zeit nach der Injektion findet man die lebhaft beweglichen Spirochäten in einer Menge vor, die der Verdünnung des spirochätenhaltigen Mäuseblutes im Blut des Kaninchens entspricht (z. B. 1 Spirochäte in 1—2 Gesichtsfeldern). Die Zahl der Parasiten nimmt dann vorübergehend erheblich ab. Aber bereits nach 24 Stunden ist eine beträchtliche Vermehrung festzustellen. Nach 2 Tagen sind sie im Blut meist so zahlreich, daß man in jedem Gesichtsfeld über 10 Spirochäten findet (X-Linse und Kompens. Ok. 7 x = 420fache Vergrößerung).

Eine als Fieber zu deutende Erhöhung der Körpertemperatur war bemerkenswerterweise bei keinem der recurrenskranken Kaninchen festzustellen, wobei zu bemerken ist, daß die Körperwärme des Kaninchens schon unter normalen Bedingungen bis 39,5° steigen kann. Ein Teil der recurrensinfizierten Kaninchen stirbt am dritten (oder schon am zweiten) Tag nach der Infektion. Das Herzblut enthält nach dem Tode reichlich bewegliche Spirochäten. Die Nieren zeigen das Bild der *akuten Nephritis*; der in der Harnblase enthaltene Urin ist dunkelbraunrot, enthält aber nur vereinzelte Erythrocyten (Hämoglobinurie).

Die Mehrzahl der Tiere übersteht die Erkrankung. Die Spirochäten sind am 3. Tage nach der Infektion bei direkter Untersuchung (Dunkelfeld) im Blut nicht mehr nachzuweisen. Und zwar geht das Verschwinden der Spirochäten sehr rasch vor sich (*Krisis*). In einem Fall konnten mikroskopisch überhaupt keine Parasiten mehr festgestellt werden, nachdem nur 20 Minuten vorher noch reichlich Spirochäten im Blut vorhanden gewesen waren.

Bei *intratestikulärer Infektion* verläuft die experimentelle Recurrens des Kaninchens ähnlich wie nach intravenöser Injektion der Spirochäten. Die Spirochäten dringen gleichfalls ins Blut ein und vermehren sich dort massenhaft. Jedoch sterben die Tiere bei diesem Infektionsmodus nicht. Dagegen sind die Parasiten auch nach dem Verschwinden aus der Zirkulation meist noch mehrere Tage durch Hodenpunktion nachzuweisen.

Im Gegensatz zur Recurrensinfektion der Maus kommt es beim Kaninchen *niemals zu Rezidiven*. Wenn die Spirochäten einmal aus

dem Blut (bzw. aus dem Hoden) verschwunden sind, reichern sie sich nicht wieder soweit an, daß ein direkter mikroskopischer Nachweis möglich wäre. Jedoch lassen sich die Spirochäten in einzelnen Fällen noch eine Zeitlang (bis zu 12 Tagen nach der Infektion) durch *Verimpfung* von Blut und Organen (Gehirn, Milz) nachweisen; im allgemeinen sind aber die Organe und das Blut bereits wenige Tage nach dem Verschwinden der direkt (mikroskopisch) nachweisbaren Spirochäten steril. Die Tiere besitzen dann eine solide Immunität, und ihr Serum enthält große Mengen spezifischer Antikörper, wie sich durch seine



Primäraffekt beim Kaninchen nach intracutaner Infektion mit Recurrensspirochäten.

Schutzwirkung gegenüber der Recurrensinfektion der Maus leicht zeigen läßt.

Die Recurrensinfektion mit dem sog. „salvarsanfesten" afrikanischen Recurrensstamm läßt sich leicht von Kaninchen zu Kaninchen in Passagen übertragen, wenn man auf dem Höhepunkt der Infektion eine genügende Menge sprochätenhaltigen Kaninchenblutes (2—5 ccm) weiterverimpft. Hierbei kommt es allerdings regelmäßig zu einer *Abschwächung der Virulenz.* Mehr als 6 unmittelbare Kaninchenpassagen konnten nicht erzielt werden. Wieweit diese Virulenzverminderung dadurch bedingt ist, daß bei der Verimpfung Antikörper mitübertragen werden, läßt sich auf Grund des vorliegenden experimentellen Materials nicht entscheiden. Die Virulenzabnahme läßt sich dadurch wieder aufheben, daß man von Zeit zu Zeit eine oder zwei Passagen auf Mäusen zwischen die Kaninchenpassagen einschaltet.

Wählt man zur Infektion des Kaninchens statt der intravenösen oder intratestikulären die subcutane Einführung der Spirochäten, so erkranken die Tiere nicht. Injiziert man dagegen das spirochätenhaltige Blut intracutan (nach vorheriger Depilation), so entwickeln sich charakteristische Infiltrationen der Haut, in denen sich die Spirochäten lange lebend erhalten (s. Abb.); nach Einstich entleeren diese Recurrens-„Schanker" ein wasserklares Sekret, das Spirochäten enthält und noch nach 14 Tagen eine Recurrensinfektion bei der Maus erzeugt. Über den beschriebenen Effloreszenzen ist die Haut bläulich verfärbt; nach Abtragung der Haut findet man ein weißliches, elastisches Gewebe, das bei makroskopischer Betrachtung gewisse Ähnlichkeiten mit dem Schankergewebe der Kaninchensyphilis besitzt. Etwa zwei Wochen nach der Infektion heilen die Recurrens-„Schanker" ab.

Ein Eindringen der Spirochäten ins Blut konnte bei den intracutan infizierten Tieren nicht nachgewiesen werden*); auch enthielt das Serum solcher Kaninchen keine Antikörper gegen Recurrensspirochäten. Eine Übertragung der Hautinfektion von Kaninchen zu Kaninchen mit Hilfe des Sekretes der Effloreszenzen war nicht möglich.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Mühlens, P.*, Rückfallfieber-Spirochäten. Handbuch der pathog. Mikroorganismen. 2. Aufl. Bd. 7. — [2]) *Kolle, W.* und *H. Hetsch*, Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten. Abschnitt „Rückfallfieber". 6. Aufl. Berlin und Wien 1922. — [3]) *Breinl, A.* and *A. Kinghorn*, An experimental study of the parasite of the African tick fever. Note on a new Spirochaeta found in a mouse. Memoir XXI of the Liverpool School of Tropical Medicine. September 1906.

*) Nach Versuchen, über die Herr Dr. *Schmidt-Ott* demnächst in anderem Zusammenhang berichten wird, muß dagegen angenommen werden, daß die Recurrensspirochäten nicht ausschließlich an Ort und Stelle verbleiben, sondern bei intrakutaner Infektion ins Lymphsystem und, wenn auch in sehr geringer Menge, auch ins Blut eindringen.

(Aus dem Sozialhygienischen Untersuchungsamt in Frankfurt a. M.
Leiter: Med.-Rat. Dr. *Ascher*.)

Über den Einfluß der sozialen Lage auf die Morbidität an Scharlach und Diphtherie.

Von
Dr. Hans Behrendt.

Mit 3 Textabbildungen.

Obwohl zahlreiche Untersuchungen lehren, daß unter den Kinderkrankheiten gerade die akuten Infektionskrankheiten am wenigsten sozialpathologische Bedeutung besitzen, kann man sich doch noch kein klares Bild darüber machen, ob die Erkrankungsziffer denn wirklich gänzlich unabhängig ist von der sozialen Lage, ob die Infektion z. B. mit Scharlach gleichmäßig arm und reich betrifft. Welche Beziehungen bestehen zwischen Empfänglichkeit eines Kindes für akute Infektionskrankheiten und dem Milieu, in dem es aufwächst? Spielen Wohlhabenheit und Wohnungsdichte eine Rolle?

Wir haben diese Fragen für Scharlach und Diphtherie nachgeprüft, zwei Krankheiten, die hinsichtlich ihrer „Verbreitung, Tenazität des Giftes, Ansteckungsweise und Feiung" eine Einheit bilden (*Pfaundler*). Zugrunde liegt das Frankfurter Material vom Januar 1920 bis Oktober 1925, d. h. alle polizeilich gemeldeten Fälle. Der Fehler, der durch die Unvollkommenheit dieser Erfassungsart im allgemeinen bedingt ist, wird wesentlich verkleinert durch die Tatsache, daß sämtliche krankgemeldeten Fälle von Fürsorgerinnen besucht wurden, denen lediglich die Kontrolle der Infektionsfälle obliegt. Durch sofortige Eintragung der für unsere Zwecke erfragten sozialen Verhältnisse (Schulart, Zimmerzahl, Beruf der Eltern usw.) wurden Unterlagen geschaffen, die den Anspruch besonderer Zuverlässigkeit machen dürfen und, wie wir glauben, bisher noch nirgends für derartige Untersuchungen zur Verfügung standen. Und dennoch wird ein sehr wesentlicher subjektiver Faktor in unsere statistischen Betrachtungen gebracht durch das weitere methodische Vorgehen bei der kritischen Sichtung des so gewonnenen Materials.

Denn um zu eruieren, wie die gemeldeten Fälle sich auf arm und reich verteilen, mußte festgestellt werden, nach welchen Gesichtpunkten das Material in diese Gruppen zerlegt werden könnte. Am befriedigend-

sten wäre es gewesen, wenn man das Einkommen der Eltern als Grundlage für die Einreihung in „arm“ oder „wohlhabend“ hätte verwenden können, analog den bekannten Tuberkulosestatistiken. Darauf mußte verzichtet werden, weil durch die veränderte Gesetzgebung keine behördlichen Unterlagen (Steuerzettel) mehr zur Verfügung stehen. Die Feststellung der Wohnungsdichte bei den rund 3000 Fällen hätte einen Aufwand an Zeit und Geld erfordert, der nicht zur Verfügung stand. Wir haben daher versucht, mit einer anderen, recht einfachen, aber sehr subjektiven Methode weiterzukommen. Wir haben einmal die Art der Schule, die von den betreffenden Patienten selbst oder deren Geschwistern besucht wurde, als Maßstab für die soziale Bewertung des Milieus benutzt und gleichzeitig den Beruf des Vaters bzw. der Eltern herangezogen. Als wertvolle Ergänzung dienten in manchen Fällen die Ausagen der Fürsorgerinnen, die persönlich die Kranken besucht hatten. Da bis zum 9. Lebensjahr heute die Schüler aller sozialen Klassen die Volksschule (Einheitsschule) besuchen, so durfte die Eintragung: Volksschule erst vom 5. Schuljahr ab bewertet werden. Wir haben zwei Gruppen, „arm“ und „wohlhabend“ unterschieden und in die zweite Gruppe nur solche Kinder rubriziert, deren Lage in irgendeiner Form als sozial gehoben angesprochen werden konnte. Weitere Unterabteilungen wurden absichtlich nicht gemacht. Es war nicht immer leicht, sich für eine der Gruppen zu entscheiden. Einige Beispiele: Ein selbständiger Handwerker muß einmal zu den Proletariern gerechnet werden, ein anderes Mal aber unbedingt zu den bevorzugten Klassen. Die Einordnung des Hauswarts einer Villa kann zu Schwierigkeiten führen. Kinder aus dem reinsten Proletarierfamilien, die in überfüllten, unhygienischen Räumen wohnen, können die höheren Schulen besuchen und dadurch falsch rubriziert werden. Im allgemeinen folgten wir der Tendenz, wenn irgendwie Zweifel auftauchten, der Gruppe „arm“ zuzuteilen, in der Überzeugung, daß die Nachkriegszeit eine Verschiebung aller sozialen Faktoren nach unten bewirkt hat. Volks- und Mittelschüler[1]) (nach dem 9. Jahr) rangierten mit ganz wenigen Ausnahmen in der Armengruppe. Berücksichtigt werden mußte auch oft die Straße, der Stadtteil, in dem die Wohnung lag, um ein Urteil über die soziale Stellung des Vaters zu erlangen. Fälle, bei denen gar keine oder nur unsichere Anhaltspunkte vorlagen, wurden ausgeschieden. Ferner erfolgte eine Trennung nach dem Alter in jeder der beiden Hauptgruppen, so daß die Altersverteilung der beiden Krankheiten bei arm und reich abgelesen werden konnte. Das erste Lebensjahr wurde wegen der Besonderheiten des Säuglingsalters und der Säuglingssterblichkeit gänzlich ausgeschaltet.

[1]) Mittelschulen sind hier keine höheren Schulen, wie in manchen Gegenden Deutschlands.

Die auf diese Weise durchgeführte kritische Sichtung von *1742 Diphtheriefällen* bei Kindern von 1—14 Jahren ergab einmal die Tatsache, daß 565 Fälle = *32,4% den sozial gehobeneren Klassen angehörten; von insgesamt 1584 Scharlachfällen betrafen 515 = 32,5% die besseren Stände*, also eine erstaunliche Übereinstimmung der Klassenverteilung bei beiden Krankheiten (s. Abb. 1). Es erregt auf den ersten Blick unsere Verwunderung, daß nicht die Proletarierkinder die erdrückende Masse der Infektionsfälle in diesem Alter aufweisen; stellt man sich doch im allgemeinen vor, daß die Zahl der vorhandenen Proletarierkinder etwa 80% sämtlicher Kinder ausmacht[1]). Danach wäre also aus unserer Aufstellung sogar auf ein ganz bevorzugtes Befallensein der „gehobeneren" Kinder zu schließen, ihre Morbidität an Diphtherie und Scharlach müßte um mehr als das Dreifache größer sein. Das erschien nicht ohne weiteres glaubwürdig, obwohl auch *Reiche*[2]) und *Rosenfeld*[3]) keine geringere Verbreitung der Infektionskrankheiten in den höheren Ständen feststellen konnten. Aber ihre Erhebungen dürften sich lediglich auf Meldungen, nicht auf Ermittelungen, stützen. Wir versuchten uns daher objektive Grundlagen zu verschaffen für die zahlenmäßige Einteilung aller Kinder Frankfurts in „ärmere" und „gehobenere". Wir fanden trotz Unterstützung durch das städtische statistische Amt keinen anderen Weg, als wiederum die Schulbildung zum Kriterium des sozialen Milieus zu machen. Wir konnten annehmen, daß gerade zum Vergleich mit unseren ähnlich gewonnenen Infektionszahlen dieses Vorgehen am geeignetsten sei. Durch das freundliche Entgegenkommen der Schulbehörde konnten wir feststellen, daß in Frankfurt in der Zeit von 1920—1925, auf die sich unser Infektionsmaterial stützt, nach der im 5. Schuljahr erfolgten Differenzierung in Volks-, Mittel- und höhere Schulen nur 16,6% aller Schüler die höheren Schulen besuchte (Tabelle 1). Wir dürfen, ohne größere Fehler zu machen als

Tabelle 1.

	Volksschulen	Mittelschulen	Höhere Schulen
1920	19 272	5155	5183
1921	19 367	4655	2921
1922	18 998	3854	4263
1923	17 907	5699	4523
1924	16 897	5496	4681
1925	15 838	5059	4075
	108 279	29 918	27 646 = 16,6%

1 38197 = 83,4%

[1]) Im Jahre 1913 waren in Frankfurt a. M. nur 17% der Zensiten zu einem Einkommen über 3000 M. veranlagt (nach frdl. Mitteilung des städt. stat. Amts).
[2]) *Mosse-Tugendreich,* Krankheit und soziale Lage.
[3]) Zentralbl. f. allg. Gesundheitspflege 1904 (zitiert nach *Grotjahn*).

in unserer geschilderten Methodik, auch hier annehmen, daß der Anteil aller lebenden Kinder aus gehobenem Milieu an der Gesamtzahl etwa ebenso groß ist, also etwa 16%, um so mehr, als die Besonderheiten des ersten Lebensjahres nicht berücksichtigt zu werden brauchten. Würde also die Verteilung der in Rede stehenden Infektionskrankheiten gleichmäßig auf „arm" und „reich" sein, so müßten in unserer Aufstellung etwa $^1/_6$ aller Diphtherie- und Scharlachfälle auf die Kinder der Wohlhabenden entfallen. In Wirklichkeit sind es ein Drittel aller Fälle, also das Doppelte. Wir müssen, bei Verwendung unserer skizzierten Methodik, *für Frankfurt a. M. eine doppelt so große Morbidität der besser gestellten Kinder*[1]) *an Diphtherie und Scharlach konstatieren als der Proletarierkinder* (s. Abb. 1). Ganz ähnliche Feststellungen konnte *Butler*[2]) über die Ansteckungsgefahr bei Masern machen. Während eine Masernepidemie in einer öffentlichen Schule in Willesden nur 2,1% der 10—15jähr. Schüler ergriff, erkrankten im College 30% der 13—17jähr. Insassen. Zur Erklärung dieses Phänomens möchten wir vor allem auf die von der Durchseuchung abhängige Empfänglichkeit hinweisen. Nach den heutigen Anschauungen müßte ein Zusammenhang zwischen Antitoxingehalt und Erkrankungshäufigkeit auch in unserem spezi-

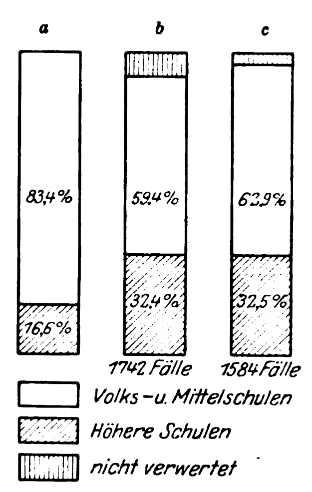


Abb. 1. Die Morbidität an Scharlach und Diphtherie in Frankfurt a. M. 1920—1925 (Durchschnittszahlen). *a* = Schulverteilung; *b* = Verteilung der Diphtheriefälle; *c* = Verteilung der Scharlachfälle.



Abb. 2. Verteilung der Diphtheriefälle auf das Lebensalter, ausgedrückt in Prozent der Gesamtfälle jeder Klasse (arm und reich).

[1]) In den Säulen b und c der Abb. 1 ist willkürlich die Gruppe „Reich" als „höhere", die Gruppe „Arm" als „Volksschüler" zur Darstellung gebracht, obwohl sich die Fälle aus Kindern vom 2. Lebensjahr an zusammensetzen.

[2]) Proc. of the roy. soc. of med. **6**, 120. 1913.

ellen Falle etwa in der Richtung vorliegen, daß im allgemeinen die Kinder aus schlechten sozialen Verhältnissen einen höheren oder länger ausreichenden Antitoxingehalt besitzen als die „Reichenkinder".

Es interessiert sowohl bei Fortführung solcher Überlegungen als auch aus anderen Gründen, einen Einblick in die Alterskurve der beiden Krankheiten zu gewinnen. Wir wissen, daß der Höhepunkt der Diphtherieerkrankungen im 2. bis 4. Lebensjahr erreicht wird, entsprechend dem vorhandenen Antitoxingehalt im Serum. Betrachten wir den Verlauf unserer Kurven, so erkennen wir, daß zwar bei den ärmeren Kindern die Verteilung der Erkrankungen auf das Lebensalter den bisherigen allgemeinen Feststellungen durchaus entpricht, daß dagegen die „Wohlhabendenkurve" anders verläuft. Sie steigt nicht nur bis zum dritten Jahr steil an, sondern unter Kreuzung der Armenkurve auch weiterhin bis zum 6. Jahr und hält sich ziemlich konstant auf dieser Höhe bis zum 14. Jahr. Dieser Befund widerspricht den bisherigen Anschauungen über den Parallelismus von Antitoxingehalt und Erkrankungshäufigkeit in den verschiedenen Lebensjahren so sehr, daß eine entsprechend differenzierte Prüfung des Antitoxingehaltes bei arm und reich notwendig erscheint.

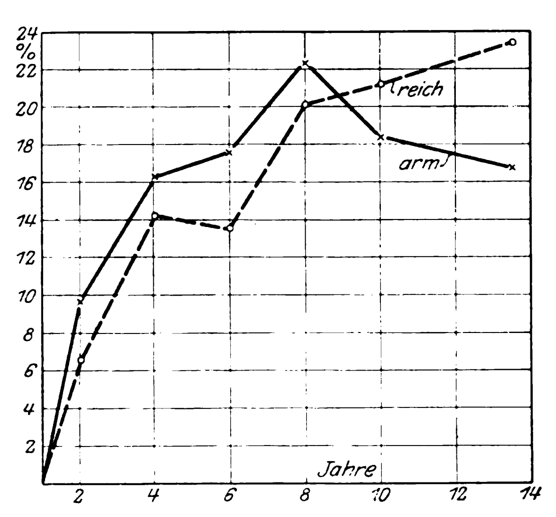


Abb. 3. Verteilung der Scharlachfälle auf das Lebensalter, ausgedrückt in Prozent der Gesamtfälle jeder Klasse (arm und reich).

Ganz ähnlich finden wir den Kurvenverlauf beim Scharlach, nur daß die Kreuzung erst später erfolgt und nicht so divergent ist wie bei der Diphtherie. Aber auch hier im Prinzip ein dauernder Anstieg der Morbidität bei den reichen Kindern, ein Höhepunkt mit folgendem Sinken bei den ärmeren; also auch nur die Armenkurve entspricht den bisherigen Anschauungen, daß der Gipfel der Scharlacherkrankungen im 7. bis 8. Lebensjahre erreicht wird (*Meyer-Schlossmann*).

Diese Feststellungen scheinen dafür zu sprechen, daß die Bedeutung des sozialen Milieus für die Disposition zu Infektionskrankheiten größer sein dürfte, als man es bisher vermutete.

(Aus der Infektionsabteilung des Städtischen Rudolph-Virchow-Krankenhauses in Berlin. — Dirigierender Arzt: Prof. *Ulrich Friedemann*, Mitglied des Instituts „Robert Koch".)

Über die Erzeugung heterospezifischer Hämagglutinine durch Injektion artfremden Serums.

I. Mitteilung.

Von

Dr. H. Deicher,

Assistenzarzt der Abteilung.

Die Immunitätslehre wurde Jahrzehnte hindurch von dem Spezifitätsgesetz beherrscht, nach welchem ein mit einem Antigen erzeugter Antikörper nur auf dieses, nicht aber auf andere Antigene wirken soll. Gewisse Abweichungen von diesem Gesetz waren zwar schon frühzeitig bekannt, wurden aber als Verwandtschaftsreaktionen gedeutet, die durch die Annahme identischer Receptoren bei nahe stehenden Antigenen unter Zuhilfenahme der *Ehrlich*schen Receptorenlehre dem Spezifitätsgesetz widerspruchslos eingefügt werden konnten. So beobachtete *Nutall* bei der Immunisierung von Kaninchen mit artfremden Eiweißkörpern die Entstehung von Präcipitinen, die nicht nur auf das zur Immunisierung benutzte Antigen, sondern in schwächerem Maße auch auf die Eiweißköper verwandter Tierspezies einwirkten. *Ehrlich* und *Morgenroth* stellten fest, daß nach der Immunisierung mit Hammelblutkörperchen Hämolysine nicht nur für Hammelblut, sondern auch für Ziegen- und Rinderblut auftreten.

Ganz vereinzelt wurden allerdings schon frühzeitig Beobachtungen gemacht, die sich dem Spezifitätsgesetz nicht zwanglos einfügten. Verschiedene Autoren (*Calmette, Lamb, Stephens, Sachs, Arthus*) teilten nämlich mit, daß das Schlangengift (Kobra)-Antitoxin nicht nur das zur Immunisierung gebrauchte Schlangengift selbst, sondern auch das Toxin von anderen Giftschlangen neutralisierte; ferner berichtete *Metschnikoff*, daß Schlangengift-Antitoxin nicht nur das Schlangengift, sondern auch das Toxin des Skorpions absättigte. Derartige Wahrnehmungen galten jedoch als seltene Ausnahmen, welche zunächst die Überzeugung von der Gültigkeit des Spezifitätsgesetzes nicht zu erschüttern vermochten. Erst im Jahre 1912 veröffentlichte *Forssmann* eine Reihe von Arbeiten über heterospezifische Antikörperwirkungen, die zeigten, daß derartigen Reaktionen offenbar eine viel größere Verbreitung zukommt. Er machte die überraschende Entdeckung, daß es durch Immunisierung von Kaninchen mit Pferde- und Meerschweinchenorganen gelingt, streng spezifische Hämolysine für Hammelblutkörperchen zu erzeugen.

Weitere Untersuchungen zeigten dann, daß das gleiche Antigen auch in den Organen der Katze, der Maus, der Schildkröte, des Hundes, des Huhns sowie in den Kiemen einiger Fische vorkommt. Im Jahre 1913 entdeckte sodann *Rothacker*, daß es auch durch Immunisierung von Kaninchen mit Paratyphus- und Gärtner-Bacillen gelingt, spezifische Hammelbluthämolysine zu erzeugen. 1924 teilte *Kritschewsky* mit, daß Kaninchen, die mit Hühnererythrocyten immunisiert wurden, ein Serum lieferten, das bei anderen Tieren eine Überempfindlichkeit gegen Hammelerythrocyten hervorrief; er demonstrierte also ein Phänomen der heterogenen passiven Anaphylaxie. Eine weitere Durchbrechung des Spezifitätsgesetzes ergaben die Versuche von *Friedberger* und *Jarre* im Jahre 1920, die zeigten, daß gelegentlich bei der Immunisierung von Kaninchen mit artfremdem Eiweiß Übergreifen der Eiweißantikörper für andere Eiweißarten vorkommt, das nicht mehr mit der Verwandtschaftsreaktion erklärt werden kann. Es präcipitierte z. B. das Serum eines mit Pferdeserum vorbehandelten Tieres Pferdeserum bis 1 : 20 000, aber in annähernd gleicher Stärke auch Eiweiß vom Rind, Hirsch, Ziege, Schwein, Hammel und sogar vom Menschen.

Als heterospezifische Antikörperreaktionen müssen wir schließlich auch die Wassermannsche und die Weil-Felixsche Reaktion bezeichnen. Bei der Lues erzeugt die Infektion mit der Spirochaeta pallida Antikörper gegen Lipoide, ohne daß deren Artcharakter für den Ausfall der Reaktion maßgebend ist; beim Fleckfieber entstehen spezifische Präcipitine für den Proteus X 19, von dem es zum mindesten zweifelhaft ist, ob er mit der Ätiologie der Erkrankung etwas zu tun hat.

In neuester Zeit teilt *Hirszfeld* mit, daß es ihm gelungen sei, durch Immunisierung mit Meerschweinchen- und Kaninchenorganen spezifische Agglutinine gegen Scharlachstreptokokken zu erzeugen.

Alle diese Beobachtungen beweisen, daß es Antigene gibt, die im Tier- und Pflanzenreiche weit verbreitet sind und somit den Artcharakter vermissen lassen. Soweit es bisher gelungen ist, in den Mechanismus dieser heterospezifischen Reaktionen einzudringen, scheint es, daß die Lipoidnatur der Antigene dabei eine Rolle spielt. So gelang es *Georgi*, den Nachweis zu erbringen, daß das heterospezifische *Forssmann*sche Antigen aus den Organen von Meerschweinchen mit Alkohol extrahierbar ist und mit den heterospezifischen Seren eine Präcipitationsreaktion gibt. Allerdings gelang es ihm nicht, mit den extrahierten Lipoiden Antikörper zu erzeugen. *Landsteiner* zeigte jedoch, daß die Antikörperbildung gelingt, wenn den Lipoiden Schweineserum zugesetzt wird. In neuerer Zeit berichten *Sachs* und seine Mitarbeiter, daß durch Immunisierung mit den verschiedensten Lipoiden unter Zusatz von Schweineserum eine positive Wassermannsche Reaktion bei Kaninchen erzeugt werden kann.

Daß diesen heterospezifischen Antikörperreaktionen eine große theoretische und vielleicht auch praktische Bedeutung zukommt, ist unzweifelhaft. Die Entdeckung neuer derartiger Reaktionen ist daher von großem wissenschaftlichen Interesse.

In der folgenden Arbeit soll über eine *neue* von uns beobachtete *heterospezifische Antikörperbildung* berichtet werden.

Unsere Versuche nahmen ihren Ausgang von einer zufälligen Beobachtung: Bei einer Patientin, die eine Injektion von 6000 JE. (12 ccm) Diphtheriepferdeserum erhalten hatte, wurde am 11. Tage nach der Injektion auf der Höhe der Serumkrankheit Blut zur Vornahme der Wassermannschen Reaktion entnommen. Von Herrn Dr. *Kurt Meyer*, dem wir das Serum übersandt hatten, erhielten wir die Mitteilung, daß die Wassermannsche Reaktion wegen der starken Agglutination der Hammelblutkörperchen nicht einwandfrei ausführbar sei. Da Hammelblutkörperchen im allgemeinen von Menschenserum nicht oder doch nur sehr gering agglutiniert werden (s. u.), so veranlaßte uns dieser auffallende Befund, die Beobachtung weiter zu verfolgen. Es lag natürlich nahe, die Hammelblutkörperchenagglutination zu der Serumkrankheit resp. der vorausgegangenen Diphtherieseruminjektion in Beziehung zu setzen. Da wir vermuteten, daß das Auftreten der Reaktion von dem Antitoxingehalt des Serums unabhängig, vielmehr nur eine Folge der Einspritzung des artfremden Eiweißes sei, so wurde bei 102 Patienten, die zu therapeutischen Zwecken zum größten Teil Heilsera, zum kleineren Teil artfremde Normalsera erhalten hatten, das Blutserum auf seine Fähigkeit, Hammelblutkörperchen zu agglutinieren, geprüft. Weitaus der größte Teil dieser Patienten hatte Pferdeserum, nur ein kleiner Bruchteil Hammelserum erhalten. *Von den 102 Patientenseren gaben 90 eine deutliche positive Agglutination mit Hammelblutkörperchen.* Unterschiede zwischen den mit antitoxischen Heilseren oder den mit Normalseren Behandelten ergaben sich hierbei nicht; auch hing das Auftreten der Reaktion nicht von der Menge oder der Art des eingespritzten Serums ab, sondern augenscheinlich von der Reaktionsfähigkeit des Organismus.

Systematische Untersuchungen über den Zeitpunkt des Auftretens dieser Agglutinationsreaktion (AR.) zeigten, daß sie nicht vor dem 7. bis 8. Tage nach der Seruminjektion zu beobachten ist. Um diese Zeit pflegt sie nur schwach ausgebildet zu sein und erreicht ihren Höhepunkt etwa um den 12. bis 13. Tag; von da ab nimmt sie an Intensität wieder ab, war aber noch Wochen und Monate, ja in 1 Fall sogar noch nach einem Jahre nach der Seruminjektion deutlich nachweisbar. Die Stärke der AR. ist in den einzelnen Fällen sehr verschieden, wie die folgende Tab. 1 zeigt, in der über die Reaktion von 90 Seren berichtet wird, die größtenteils am 10. bis 13. Tage nach der Seruminjektion entnommen wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Menge des injizierten Serums durchaus nicht auf die Stärke der AR. von Einfluß ist, sondern daß diese wohl lediglich durch individuelle Verschiedenheiten in der Tätigkeit der reagierenden Organe bestimmt wird. Auch nach Injektion ganz geringer Serumdosen (1—2 ccm) erhielten wir gelegentlich sehr starke AR.

Tabelle 1.

Blutkörperchenarten	Gesamtzahl d. Untersuchungen einschl. Kontrollen	Von den Behandeltenseren agglutinierten bis									Normalsera
		Verdünn. 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Hammel	302	—	9	27	20	15	11	6	2	—	Meist 0, sehr selten bis 1:2
Pferd[1])	31	—	—	2	2	2	6	4	6	1	Bis höchstens 1:16, meist weniger
Kaninchen[1]) . . .	14	—	—	—	—	—	1	1	3	3	Bis höchstens 1:128 (1 mal), meist weniger
Meerschweinchen[1]) .	9	—	—	—	1	3	1	2	—	—	Bis höchstens 1:32, meist weniger
Schwein[1])	10	—	—	—	—	1	1	1	2	2	Bis 1:128. Starke agglutinierend Wirkung des Normalserums
Rind[2])	8	2	—	—	—	2	—	—	—	—	Keine agglutinierende Wirkung des Normalserums
Huhn[2])	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Keine agglutinierende Wirkung der Sera

Die schwach agglutinierenden Sera (bis 1 : 8) **stammen durchweg von Patienten, bei denen die Seruminjektion schon längere Zeit (bis zu 1 Jahr) zurücklag, von Behandelten ohne Serumexanthem oder schließlich von solchen, bei denen die AR. früher als 10 Tage nach der Seruminjektion auftrat (s. Text).**

Es erhob sich nun die Frage, ob diese AR. zu der Serumkrankheit in ursächlicher Beziehung steht. Überblicken wir unter diesem Gesichtspunkt unser Material, so ergibt sich, daß von 102 mit Serum behandelten Fällen nur 42 eine klinisch nachweisbare Serumkrankheit zeigten; wir sehen also, daß das Auftreten der AR. von dem Vorhandensein klinischer Symptome einer Serumkrankheit unabhängig ist. Natürlich beweist dieses noch nicht, daß ein Zusammenhang zwischen Serumkrankheit und AR. nicht besteht; denn es könnte sehr wohl sein, daß beiden Erscheinungen zwar die gleiche Ursache zugrunde liegt, die Veränderungen in vivo aber so geringfügige sind, daß sie der klinischen Wahrnehmung entgehen. Es wäre denkbar, daß beide Erscheinungen durch physikalisch-chemische Veränderungen der Serumkolloide ausgelöst werden, Veränderungen, die nur dann klinische Symptome hervorzurufen vermögen, wenn die Erfolgsorgane, vor allen Dingen die Blutcapillaren, konstitutionell bestimmte Vorbedingungen erfüllen, um auf die Blutveränderungen zu reagieren.

Beweisender ist deshalb die folgende Versuchsreihe, in der bei einer Reihe von Patienten das Auftreten der Serumkrankheit und der AR. zeitlich verfolgt wurden. Unter den genau registrierten 11 Fällen (Tab. 2) befinden sich 5 Erstinjizierte (Nr. 34, 303, 347, 354, 366), die

[1]) Nicht zu verwenden, da zu starke Agglutinabilität durch Normalserum.
[2]) Nicht zu verwenden, da zu wenig bzw. überhaupt nicht agglutinabel.

Tabelle 2.

um	Seruminjektion	18. VI. 1925							
34	Serumkrankheit	30. VI. 1925							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8					
	30. VI. 1925	±	±	±					12 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	1. VII. 1925	++	++	+					Exanthem abgeklungen, 13 Tage nach Injektion
um	Seruminjektion	19. XI. 1925							
303	Serumkrankheit	26. XI. 1925							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8					
	26. XI. 1925	0	0	0					7 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	4. XII. 1925	++++	+++	+					Exanthem abgeklungen, 15 Tage nach Injektion
um	Seruminjektion	4. I. 1926							
347	Serumkrankheit	13. I. 1926							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16				
	13. I. 1926	++	+	+	0				9 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	14. I. 1926 ·	++	++	+	+				Exanthem abgeklungen, 10 Tage nach Injektion
um	Seruminjektion	25. I. 1926							
354	Serumkrankheit	3. II. 1926							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64		
	3. II. 1926	++	++	+	±	0	0		10 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	5. II. 1926	++++	++++	+++	++	+	+		Exanthem noch vorhanden, 12 Tg. nach Injektion
um	Seruminjektion	5. II. 1926 und 9. II. 1926							
366	Serumkrankheit	13. II. 1926							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8					
	13. II. 1926	0	0	0					8 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	15. II. 1926	++++	+++	+					Exanthem noch vorhanden, 10 Tage nach Injektion
um	Seruminjektion	7. II. 1926							
370	Serumkrankheit	13. II. 1926							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 82	1 : 64	1 : 128	
	13. II. 1926	+++	+	+	0	0	0	0	6 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	17. II. 1926	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	Exanthem abgeblaßt, 10 Tage nach Injektion
um	Seruminjektion	25. II. 1926							
496	Serumkrankheit	1. III. 1926							
	I. Reaktion am	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16				
	1. III. 1926	++	+	+	0				5 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am								
	11. III. 1926	+++	+	+	+				15 Tage nach Injektion, Serumexanthem abgeklungen

Tabelle 2 (Fortsetzung).

Serum								
Serum Nr. 530	Seruminjektion	12. III. 1926						
	Serumkrankheit	19. III. 1926						
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16			
	I. Reaktion am 19. III. 1926	0	0	0	0			7 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am 24. III. 1926	+ + +	+ + +	+ + +	+			Serumexanthem abgeklungen, 12 Tage [illegible] Injektion
Serum Nr. 542	Seruminjektion	16. III. 1926 und 19. III. 1926						
	Serumkrankheit	21. III. 1926						
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16			
	I. Reaktion am 22. III. 1926	±	0	0	0			4 Tage nach 2. Injektion
	II. Reaktion am 31. III. 1926	+ + +	+ +	+	±			12 Tage nach 2. Injektion, Serumexa[illegible] abgeklungen
Serum Nr. 552	Seruminjektion	20. III. 1926						
	Serumkrankheit	26. III. 1926						
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	
	I. Reaktion am 26. III. 1926	+ +	+ +	+	0	0	0	6 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am 31. III. 1926	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ +	+	11 Tage nach Injektion, Ser[illegible] exanthem abgeklungen
Serum Nr. 563	Seruminjektion	6. IV. 1926						
	Serumkrankheit	10. IV. 1926						
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32		
	I. Reaktion am 10. IV. 1926	0	0	0	0	0		4 Tage nach Injektion
	II. Reaktion am 16. IV. 1926	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ +	+		10 Tage nach Injektion, Serumexa[illegible] abgeklungen

Serumkrankheit trat bei ihnen am 7., 8., 9., 10. und 12. Tage, die AR am 15., 10., 10., 12. und 13. Tage nach der Injektion auf. Bei den 6 reinjizierten Fällen (den übrigen) wurde die Serumkrankheit am 4., 4.. 5., 6., 6., 7., die AR. am 10., 12., 15., 11., 10. und 12. Tag festgestellt. Die Versuche zeigen, daß in allen diesen Fällen die Serumkrankheit der AR. um mehrere Tage vorausging. Aus dieser Beobachtung können wir mit Sicherheit schließen, daß die der AR. zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Veränderungen des Blutes nicht die Ursache der Serumkrankheit sein können. Als Unterstützung für eine solche Annahme kann noch gelten, daß die therapeutische Verwendung (intravenöse Injektion) von 10% NaCl-Lösung zwar die subjektiven Beschwerden des Kranken und die Serumkrankheit selbst günstig zu beeinflussen vermag, aber die Stärke der AR. nach Gaben in vivo oder gar nach Zusatz im Reagensglas nicht abschwächt. Ferner sei hier erwähnt, daß alle die Seren von Meerschweinchen und Kaninchen, die während des anaphylaktischen Schocks gewonnen waren, niemals Agglutinine für Hammelblut zeigten; geprüft wurden 5 Meerschweinchen

und 3 Kaninchen. Auf die Ursachen des eigentümlichen zeitlichen Verhaltens von AR. und Serumkrankheit werden wir später in anderem Zusammenhange zurückkommen.

Daß normalerweise schon die Agglutination von Hammelblutkörperchen durch Menschenseren in erheblicherem Maße erfolgt, ergab sich nie. Einmal agglutinierte ein „Normal“serum bis 1 : 64; bei genauen Nachforschungen stellte sich aber heraus, daß der Patient — ein Kind aus einer Heil- und Pflegeanstalt — vor etwa 8 Wochen eine prophylaktische Diphtherieseruminjektion erhalten hatte. Es ist also möglich, daß die als starke Normalagglutination bekannt gewordenen ganz seltenen Fälle (*Meyer*, s. u.) von solchen Patienten stammen, die ohne Wissen des Untersuchers vor längerer Zeit eine Injektion artfremden Serums erhalten haben. Die sonst zahlreich — etwa 200 — angesetzten Kontrollen mit Normalseren oder Seren von Erkrankten (Typhus, Scharlach, Masern, Diphtherie, Erysipel, Sepsis, Erythema multiforme, Tuberkulose, Lues usw.) ergaben niemals eine erheblicher beachtliche AR., sondern waren meistens negativ, höchstens gelegentlich bis 1 : 2 positiv. Auch die mit stark Wassermann-positiven Seren besonders angesetzten Kontrollen waren ausnahmslos negativ.

Die bisher mitgeteilten Feststellungen stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Versuche, die wir über die biologische und klinische Bedeutung der AR. angestellt haben. Als wir anfänglich die AR. regelmäßig im Verlauf der Serumkrankheit auftreten sahen, hatten wir die Vermutung, daß diese in enger Beziehung zum anaphylaktischen Schock oder dessen bei der Serumkrankheit anzunehmenden Äquivalenten stünde. Bekanntlich vertritt eine Reihe von Autoren (*Nolf*, *Doerr*, *Sachs*) die Ansicht, daß der anaphylaktische Schock durch physikalisch-chemische Veränderungen der Blutkolloide hervorgerufen wird, die von *Widal* als Kolloidoklasie bezeichnet werden. Wir glaubten annehmen zu dürfen, daß die AR. der Ausdruck dieser kolloidalen Zustandsänderungen sei und somit als Indicator für die anaphylaktische Natur klinischer Zustände benutzt werden könnte. Wäre diese Ansicht zutreffend, so hätten wir damit eine für die Pathogenese zahlreicher Krankheitsbilder sehr wichtige Methode gewonnen. Aus dem kürzlich erschienenen Referat von *Doerr* (Weichardts Ergebnisse) über Anaphylaxie geht hervor, daß über die Zugehörigkeit der Idiosynkrasien (Arzneimittel, Überempfindlichkeit gegen Nahrungsmittel, Heufieber, Asthma bronchiale) zur Anaphylaxie die Ansicht recht geteilte sind. Beim Asthma bronchiale ist es überdies zweifelhaft, ob alle Formen der Erkrankung überhaupt in das Gebiet der Überempfindlichkeit gehören. Wir hofften nun, mit Hilfe der AR. die Frage nach der anaphylaktischen Natur dieser Vorgänge klären zu können; wir haben deshalb das Serum einer größeren Reihe von Patienten

während des Auftretens idiosynkrasischer Reaktionen auf das Vorhandensein von Hammelblutagglutininen geprüft. Es handelt sich um:

1 Jodexanthem.
2 Salvarsanexantheme.
1 Antipyrinexanthem.
7 Goldexantheme.
2 Chininexantheme.
1 Quecksilberexanthem.
1 Aspirinexanthem.
15 Urticaria.
8 Asthma bronchiale.

Die AR. war in allen Fällen mit Ausnahmen des Antipyrinexanthems negativ. Wir teilen diese Resultate mit, ohne daraus weitgehende Schlüsse ziehen zu wollen, nachdem sich gezeigt hat, daß auch bei der Serumkrankheit das Auftreten der AR. mit den Krankheitserscheinungen offenbar nichts zu tun hat. Leider standen uns Fälle von Eiweiß-Idiosynkrasien (Eiereiweiß, Fischeiweiß) nicht zur Verfügung; es wird gewiß von besonderem Interesse sein, in derartigen Fällen das Serum zu untersuchen.

Nachdem wir somit das Auftreten der AR. in ihren zeitlichen Verhältnissen und bei verschiedenen Krankheitszuständen geschildert haben, wollen wir im nachstehenden versuchen, in die serologische Analyse dieser Reaktion weiter einzudringen.

Zur *Technik* sei zunächst folgendes bemerkt: Für die Anstellung der Reaktion hat sich frisches defibriniertes Hammelblut als zweckmäßiges Reagens erwiesen, während Citratblut weniger deutliche Resultate gab. Das Blut wurde stets mehrfach mit 0,85% NaCl-Lösung gewaschen und in 5% Aufschwemmung benutzt. Dem Patientenserum in abfallenden Mengen, und zwar in den Mengen von 0,5; 0,25; 0,125 ccm usw., wurde je 1 ccm der Hammelblutkörperchenaufschwemmung zugesetzt, Gesamtvolumen 2 ccm. Die Reaktion tritt meist in wenigen Minuten ein; das Resultat wird aber am besten erst nach 2stündigem Stehen bei Zimmertemperatur abgelesen, um die schwächeren Ausfälle noch mit zu erfassen. Brutschrankaufenthalt beschleunigt das Auftreten der AR. nicht, auch wird die Stärke nicht beeinflußt. Die Verklumpung der Hammelerythrocyten ist eine sehr intensive, und es ist schwierig, bei stärkerem Ausfall der Reaktion überhaupt unmöglich, die Konglomerate wieder zu zerschütteln. Wird bei der Reaktion aktives Serum benutzt, so ist in den ersten Röhrchen die Agglutination häufig schlecht zu beobachten, da sie durch die gleichzeitig eintretende Hämolyse gestört wird. Diese Schwierigkeit kann durch halbstündiges Inaktivieren des Serums bei 56° beseitigt werden, ein Eingriff, durch den die agglutinierende Kraft nicht beeinflußt wird. Im inaktiven Zustand scheint das Serum seine agglutinierenden Fähigkeiten unbegrenzt beizubehalten.

Wir haben nun geprüft, ob die AR. nur Hammelblut gegenüber oder auch bei anderen Blutarten nachweisbar ist. Hammelblut ist insofern besonders geeignet, als normales Menschenserum dieses im allgemeinen nicht agglutiniert (s. o.). Die Untersuchung einer größeren Reihe von Blutarten zeigte uns, daß zum mindesten eine sehr erhebliche

Verstärkung der AR. in fast allen Fällen nachweisbar ist. Die Tab. 1 gibt an, daß alle Blutarten mit Ausnahme des Hühnerblutes von unseren Seren erheblich stärker als von Normalseren agglutiniert wurden.

Es erhob sich nun die Frage, ob nach der Injektion von artfremdem Serum im Menschenserum ein einheitliches Agglutinin für alle Blutarten

Tabelle 3.

Agglutination mit	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	Kontrolle	Unabsorbiert Agglutination bis
	1. Absorption der Hammelblutagglutinine. Serum Nr. 1.										
mmelblutkörperchen (Titerprobe)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0	0	0	
—	Absättigung mit unverdünnten Hammelblutkörperchen zu gleichen Teilen, 3/4 Std. bei Zimmertemperatur										
nmehr mit Hammelblutkörperchen	++++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	1 : 128
erdeblutkörperchen	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	0	1 : 512
aninchenblutkörchen	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	0	1 : 512
	2. Absorption der Pferdeblutagglutinine. Serum Nr. 184.										
erdeblutkörperchen (Titerprobe)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	0	
—	Absättigung mit unverdünnten Pferdeblutkörperchen zu gleichen Teilen, 3/4 Std. bei Zimmertemperatur										
unmehr mit Pferdeblutkörperchen .	++++	++++	++++	++++	+++	0	0	0	0	0	1 : 512
ammelblutkörperchen	++++	++++	++++	++++	+++	+	0	0	0	0	1 : 64
eerschweinchenblutkörperchen .	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	0	0	0	1 : 128
aninchenblutkörperchen	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	0	1 : 512
hweineblutkörperchen	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	0	1 : 512
	3. Absorption der Schweineblutagglutinine. Serum Nr. 376.										
hweineblutkörperchen [Titerprobe]	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	0	
—	Absättigung mit unverdünnten Schweineblutkörperchen zu gleichen Teilen, 3/4 Std. bei Zimmertemperatur										
unm. mit Schweineblutkörperchen .	+++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	1 : 512
ferdeblutkörperchen	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	0	1 : 512
lammelblutkörperchen	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 : 128 !

auftritt, oder ob die Blutkörperchen der verschiedenen Tierarten durch eine Schar spezifischer Agglutinine ausgeflockt werden. Um diese Frage zu entscheiden, benutzten wir die schon von *Malkoff* bei den Normalagglutininen angewandte Methode der spezifischen Absorption.

Die vorstehenden Tabellen (3), die nur eine kurze Übersicht geben sollen und daher nur eine kleine Zahl unserer Versuche in dieser Richtung darstellen, zeigen, daß die Absorption im allgemeinen eine spezifische ist, d. h., daß die Agglutinine nur für die Blutarten verschwinden, mit denen die Absorption vorgenommen wurde. Eine Ausnahme macht das Schweineblut, das nicht nur die Agglutinine für Schweineblutkörperchen, sondern auch die für Hammelblutkörperchen entfernte. Derartige Ausnahmen von der *Malkoff*schen Regel sind jedoch bereits von *Landsteiner* und seinen Mitarbeitern bei Normalagglutininen beobachtet worden. *Die nach der Injektion von artfremdem Serum im Menschenserum auftretenden Agglutinine sind* demnach in gleicher Weise *spezifisch* wie die Normalagglutinine.

Im Anschluß an diese Versuche möchten wir noch kurz mitteilen, daß wir neben Blutkörperchen auch Bakterien zur Anstellung der AR. benutzt haben, und zwar: Bac. Pyocyaneus, Ruhr Shiga, Ruhr Flexner, Proteus X 19, Typhus, Coli, Paratyphus A, Vibrio Metschnikoff, Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus scarlatinae. Es ergab sich jedoch, daß die A. R. gegenüber Bakterien nicht stärker ausfiel als mit normalem menschlichen Serum.

Es könnte nach den mitgeteilten Resultaten scheinen, als ob es sich bei der AR. lediglich um eine Verstärkung der Normalagglutinine handle. Wir möchten uns jedoch in dieser Hinsicht zurückhaltend ausdrücken, da auch die durch Normalagglutinine (des Menschenserums) ganz inagglutinablen Blutarten, wie Rinder- und Hammelblut, vom Serum der mit Pferde- oder Hammelserum vorbehandelten Menschen stark agglutiniert werden. Auf diese wichtige Frage werden wir in der nächsten Publikation über dieses Thema zurückkommen.

Wir wenden uns vielmehr der Frage zu, in welchem Zusammenhang die AR. mit der Eiweiß-Antikörperbildung steht. Daß ein solcher vorhanden war, schien uns zunächst ganz selbstverständlich zu sein, da die AR. durch das gleiche Antigen wie die Präcipitine hervorgerufen wurde und auch die Inkubationszeit für das Auftreten beider Reaktionen genau übereinstimmte.

Diese Vermutung lag auch um so näher, als *Bordet* bereits im Jahre 1913 über Beziehungen der Blutkörperchen-Agglutination zum spezifischen Präcipitationsvorgang berichtete. *Bordet* beobachtete, daß Meerschweinchenblutkörperchen sehr stark agglutiniert wurden, wenn er sie einer Mischung von Kaninchenserum und dem Serum eines mit Kaninchenserum immunisierten Meerschweinchens zusetzte. Auch mehrere Eiweiß-Antigen-Antikörpergemische vermochten Meerschweinchenblutkörperchen zu agglutinieren, wenn auch nicht alle. Die Reaktion trat am stärksten ein, wenn das Eiweiß und sein Antigen in Mengenverhältnissen gemischt wurde (Antigenüberschuß), in denen eine deutliche Präcipitation nicht zu be-

obachten war, und *Bordet* nahm an, daß die unsichtbaren Antikörper-Antigen-Komplexe die Blutkörperchen zur Ausflockung bringen. Diese Reaktion wurde von *Bordet* als Koagglutination bezeichnet.

Da nach der Ansicht von *Pirquet* und *Schick* im Stadium der Serumkrankheit das Pferdeserum und sein Antikörper nebeneinander im Blute kreisen, so waren also in unserem Falle die Voraussetzungen zur Koagglutination gegeben. Allerdings machte uns die lange Persistenz der AR. nach der Seruminjektion (in einem Falle bis zu 1 Jahr) gegen diese Deutung mißtrauisch. Es schien von vornherein unwahrscheinlich, daß das Pferdeserum so lange im Menschenserum kreisen sollte. Wir haben deshalb systematische Untersuchungen über den Verbleib des Pferdeserums (oder Hammelserums) im Menschenblut nach Seruminjektion angestellt, indem wir das Serum der vorbehandelten Menschen in verschiedenen Intervallen nach der Injektion Meerschweinchen injizierten und durch Reinjektion von Pferde- bzw. Hammelserum prüften, ob die Meerschweinchen sensibilisiert waren.

Der Eintritt eines anaphylaktischen Schocks war allerdings nicht ohne weiteres im Sinne einer aktiven Sensibilisierung der Meerschweinchen zu deuten, da möglicherweise die Versuche auch durch passive Übertragung des im Menschenserum enthaltenen Eiweiß-Antikörpers zu erklären waren; wissen wir doch, daß der zugeführte Antikörper auch bei Injektion von heterologem Serum durch die Reinjektion von Pferdeserum noch nach etwa 14 Tagen nachweisbar ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, haben wir Kontrollen angestellt, bei denen die Reinjektion von Pferde- bzw. Hammelserum schon nach 24 Stunden vorgenommen wurde. Diese Versuche fielen völlig negativ aus, womit erwiesen ist, daß eine passive Anaphylaxie nicht in Frage kommt.

In demselben Sinne sprechen Versuche, in denen die Tiere erst 4—5 Wochen nach der Injektion des sensibilisierenden Menschenserums reinjiziert wurden, da es feststeht, daß um diese Zeit der heterologe Antikörper bereits aus dem Meerschweinchenorganismus verschwunden ist.

Über unsere Versuchungsergebnisse im einzelnen geben die folgenden Tabellen (4 a, b, c) Auskunft, die wiederum wegen Raumersparnis nur einen Teil unserer Versuchsprotokolle umfassen. Sie zeigen, daß in der Tat mindestens bis zum 13. Tage das Pferde- bzw. Hammelserum-Antigen durch den Meerschweinchenversuch im Menschenblut nachweisbar ist. Ob dies auch noch nach längerem Intervall der Fall ist, können wir mangels daraufhin angestellter Versuche nicht entscheiden.

War somit die für die Koagglutination unerläßliche Anwesenheit des Pferde- bzw. Hammelserum-Antigens in unseren Seren erwiesen, so haben doch weitere Versuche die Annahme einer Koagglutination als Ursache der AR. nicht möglich erscheinen lassen.

Zunächst zeigte uns eine Nachprüfung der *Bordet*schen Versuche, über die Herr Dr. *Lechner* in Kürze eine Publikation erscheinen lassen wird, daß bei der Koagglutinationsreaktion ganz andere Verhältnisse beobachtet werden als bei der AR. Es stellte sich nämlich heraus, daß durch die Eiweißantikörper-Antigen-Kombination überhaupt nur Meerschweinchenblutkörperchen agglutiniert werden,

während bei der AR., wie wir bereits mitteilten, fast alle Blutkörperchenarten das gleiche Verhalten zeigten.

Tabelle 4 a. *Meerschweinchenversuch.*

Tier Nr.	80	70	94	55
Menschenserum. Subcutan am	Nr. 184[1]), 1 ccm 19. XI. 1925	Nr. 327[2]), 2 ccm 16. XII. 1925	Nr. 336[3]), 2 ccm 18. XII. 1925	Nr. 563[4]) 1 ccm 14. IV. 1926
Reinjektion intravenös	0,5 ccm Pferdeserum	0,5 ccm Hammelserum	0,5 ccm Pferdeserum	0.5 ccm Pferdeserum
Am	15. XII. 1925	10. I. 1926	10. I. 1926	6. V. 1926
Zeitabstand der Injektion	**26** Tage	**25** Tage	**23** Tage	**21** Tage
Anaphylaxie	++++ Tod im Schock	++++ Atemnot, Krämpfe, Stuhlabgang, Temperatursturz	++++ Tod im Schock	++ Atemnot, Naseputzen, Husten, Juckreiz

Tabelle 4 b.

Tier Nr.	88	100	27
Menschenserum. Subcutan am	Nr. 327[5]), 0,7 ccm 16. XII. 1925	Nr. 324[6]), 2 ccm 16. XII. 1925	Nr. 566[7]), 1 ccm 16. IV. 1926
Reinjektion intravenös	0,5 ccm Hammelserum	0,5 ccm Hammelserum	0,5 ccm Pferdeserum
Am	28. I. 1926	28. I. 1926.	25. V. 1926
Zeitabstand der Injektionen	**32** Tage	**32** Tage	**39** Tage
Anaphylaxie	+++ Atemnot, Lähmung, Stuhl- u. Urinabgang	+++ Krämpfe, Husten, Naseputzen, Temperatursturz	++ klonische Krämpfe, Stuhl- und Urinabgang, Juckreiz

[1]) Ser. 184: 12. Tag nach 125 ccm Tetanus-Pferdeserum, Exanthem bereits abgeblaßt, Agglutination für Hammelblut 1 : 128 ++.

[2]) Ser. 327: 12. Tag nach 30 ccm Diphtherie-Hammelserum; kein Exanthem. Agglutination für Hammelblut 1 : 16 ++.

[3]) Ser. 336: 10. Tag nach 12 ccm Diphtherie-Pferdeserum; Exanthem ++. Agglutination für Hammelblut 1 : 32 +.

[4]) Ser. 563: Siehe Tab. 4 c.

[5]) Ser. 327: Siehe Tab. 4 a.

[6]) Ser. 324: 13. Tag nach 10 ccm Diphtherie-Hammelserum: kein Exanthem. Agglutination für Hammelblut bis 1 : 4 +, für Pferdeblut bis 1 : 64 +.

[7]) Ser. 566: 11. Tag nach 16 ccm Diphtherie-Pferdeserum. Exanthem abgeblaßt. Agglutination für Hammelblut bis 1 : 32 +.

Tabelle 4c.

Nr.	28	29	81	32	57	58
...schenserum -	Nr. 566[1]) 1 ccm ip. 16. IV. 1926	Nr. 566[1]) 1,5 ccm sc. 16. IV. 1926	Nr. 566[1]) 2,5 ccm ip. 17. IV. 1926	Nr. 566[1]) 5 ccm ip. 17. IV. 1926	Nr. 563[2]) 1 ccm ip. 14. IV. 1926	Nr. 563[2]) 1,5 ccm sc. 14. IV. 1926
...jektion iv.	0,5ccm Pferdeserum 17. IV. 1926	0,5 ccm Pferdeserum 17. IV. 1926	0,5 ccm Pferdeserum 18. IV. 1926	0,5 ccm Pferdeserum 18. IV. 1926	0,5 ccm Pferdeserum 15. IV. 1926	0,5 ccm Pferdeserum 15. IV. 1926
...abstand der ...jektion . .	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden
...phylaxie .	gesund	gesund	leichte Unruhe, sonst keineZeichen, Temp. normal	gesund	gesund	gesund

Weitere Versuche überzeugten uns dann, daß die AR. mit den Eiweißantikörpern überraschenderweise überhaupt nichts zu tun hat. Es gelingt nämlich, die Eiweißantikörper aus dem Serum zu entfernen, ohne daß die AR. dadurch irgendwie beeinflußt wird. Dieser Versuch ließ sich allerdings mit Menschenserum nicht ausführen, da bekanntlich beim Menschen nach der Injektion von artfremdem Eiweiß Präcipitine im Serum nur sehr selten und unregelmäßig auftreten. Wir suchten daher festzustellen, ob die AR.nicht auch nach der Injektion von artfremdem Serum bei Kaninchen zu beobachten ist. Nach vielen vergeblichen Bemühungen mit Pferdeserum gelang es uns schließlich, durch Immunisierung von Kaninchen mit Rinderserum eine deutliche AR. zu erzielen.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß beim Kaninchen nach der Injektion von Rinderserum neben den Präcipitinen für Rinderserum Agglutinine für Hammelerythrocyten auftreten. Der Ausfällungsversuch des Kaninchenimmunserums mit Rinderserum beweist jedoch eindeutig, daß die Präcipitine mit den Agglutininen nichts zu tun haben, denn trotz gänzlicher Entfernung der Präcipitine war die AR. quantitativ in unveränderter Stärke erhalten.

Wir stehen daher vor der bemerkenswerten Tatsache, daß die Agglutinine für artfremde Blutkörperchen zwar nach der Injektion von artfremdem Serum und nach der beim Menschen bekannten Inkubationszeit für die Antikörperbildung auftreten, daß sie aber trotzdem mit den Eiweißantikörpern nichts gemein haben.

Einen weiteren Einblick in den Mechanismus dieser Reaktion gewährte uns nun die Vorbehandlung der Patienten mit den verschiede-

---

[1]) Ser. Nr. 566: Siehe Tab. 4b.

[2]) Ser. Nr. 563: 4. Tag nach 16 ccm Diphtherie-Pferdeserum. Serumexanthem ++++. Agglutination für Hammelblut negativ.

Tabelle 5a.

Datum 1926	Kaninchen 24					
					1 : 2	1 : 4
3. II.	Serum agglutiniert Hammelblut				0	0
3. II.	2,0 ccm Rinderserum intravenös					
6. II.	2,0 „ „ „					
9. II.	3,0 „ „ „					
12. II.	3,0 „ „ „					
15. II.	3,0 „ „ „					
18. II.	3,5 „ „ „					
21. II.	4,0 „ „ „					
23. II.	4,0 „ „ „					
2. III.	Blut entnommen. Serum	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
	agglutin. Hammelblut	++	+	±	0	0
6. III.	desgl.	++++	++++	+++	+	+
		1 : 10	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000	
6. III.	Präcipitine gegen Rinderser.	++++	++++	++++	++	
6. III.	Kaninchenserum + Rinderserum $^1/_{32}$ zu gleichen Teilen, Flocken abzentrifugiert.					
6. III.	In dem Rückstand nunmehr Präcipitine		1 : 10	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000
	gegen Rinderserum		+++	+	0	0
6. III.	Das z. T. von den Präcipitinen befreite Kaninchenserum ag-	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
	glutiniert Hammelblut . .	++++	+++	++	+	+
6. III.	Erneut dieses z. T. absorbierte Kaninchenserum + Rinderserum. Flocken wieder abzentrifugiert.					
			1 : 10	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000
6. III.	Nunmehr Präcipitine gegen Rinderserum		0	0	0	0
6. III.	Dieses von den Präcipitinen befreite Serum agglutiniert	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
	Hammelblut	++++	+++	++	+	+

nen Fraktionen des Pferdeserums. Zur Verfügung standen uns die von der Elektro-Osmose-Gesellschaft auf elektro-osmotischen Wege hergestellten Fraktionen Euglobulin, Pseudoglobulin und Albumin.

Aus den Versuchen von *Doerr* und *Berger* wissen wir, daß sämtliche Fraktionen imstande sind, beim Meerschweinchen Anaphylaxie zu erzeugen, doch bestehen gewisse quantitative Unterschiede, indem die Euglobuline am stärksten, in zweiter Linie die Pseudoglobuline und erst zuletzt und am wenigsten die Albumine sensibilisierend wirken. Auch die Inkubationszeit für den Eintritt der Anaphylaxie ist bei den einzelnen Eiweißfraktionen verschieden, und zwar bei den Albuminen länger als bei den Globulinen. Über die Bedeutung der Eiweißfraktionen für die Serumkrankheit des Menschen liegen bisher unseres Wissens keine Untersuchungen vor; in einer besonderen Publikation wird darüber berichtet werden. Wir können schon hier vorwegnehmen, daß, mit der intracutanen Methode geprüft, der anaphylaktische Zustand beim Menschen mit den Globulinen leichter und deutlicher nachweisbar ist als mit den Albuminen.

Als wir nun das Auftreten der AR. nach der Injektion der verschiedenen Serumfraktionen untersuchten, kamen wir zu dem für uns

Tabelle 5 b.

Datum 1926	Kaninchen 25				
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	
3. II.	Serum agglutiniert Hammelblut	0	0	0	
3. II.	2,0 ccm Rinderserum intravenös				
6. II.	2,0 „ „ „				
9. II.	3,0 „ „ „				
12. II.	3,0 „ „ „				
15. II.	3,0 „ „ „				
18. II.	3,5 „ „ „				
21. II.	4,0 „ „ „				
23. II.	4,0 „ „ „ Anaphylaktischer Schock				
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	
2. III.	Blut entnommen. Serum agglutiniert Hammelblut	+	+	+	
6. III.	desgl.	++++	++	±	
		1 : 10	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000
6. III.	Präcipitine gegen Rinderserum	++++	++++	+++	+
6. III.	Kaninchenserum + Rinderserum 1 : 32 zu gleichen Teilen, Flocken abzentrifugiert.				
		1 : 10	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000
6. III.	In dem Rückstand nunmehr Präcipitine gegen Rinderserum	0	0	0	0
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	
6. III.	Dieses von den Präcipitinen befreite Serum agglutiniert Hammelblut	+++	++	±	

Bei beiden Kaninchen keine Einwirkung der Präcipitinabsorption auf die Agglutinine.

überraschenden Resultat, daß die Euglobuline und Pseudoglobuline nur ganz gering oder gar nicht wirksam sind, während offenbar die ganze antigene Funktion für die AR. an der Albuminfraktion haftet (Tab. 6).

Tabelle 6.

Fraktionen	Euglobulin	Pseudoglobulin	Albumin
Gesamtzahl der Injektionen (je 5 bis 10 ccm pro dosi)	6	8	9
Davon Positive . .	2 (Höchsttiter 1 : 4)	2 (Höchsttiter 1 : 4)	8 (Höchsttiter 1 : 16)
Negative	4	6	1

Auch eine wiederholte Injektion der verschiedenen Fraktionen vermochte an dem Resultat nichts zu ändern.

Diese Versuchsresultate lassen es uns zweifelhaft erscheinen, ob überhaupt Eiweißkörper als Antigene für die AR. in Frage kommen. Es muß vielmehr ernstlich erwogen werden, ob nicht eine den Eiweißkörpern beigemischte Substanz, vor allem z. B. Lipoide, den Ausschlag geben. Mit Versuchen in dieser Richtung sind wir beschäftigt, die Ergebnisse werden wir demnächst bekanntgeben.

Die Befunde über das verschiedene Verhalten der Eiweißfraktionen geben vielleicht eine Erklärung dafür ab, warum die AR. in einer Anzahl von Fällen erst mehrere Tage nach der Serumkrankheit auftrat (Tab. 2): Die AR. hat eben die lange Inkubationszeit der Antikörper gegen die Albuminfraktion, während der Eintritt der Serumkrankheit durch das Auftreten der Globulinantikörper bestimmt wird, denen nach den Versuchen von *Doerr* und *Berger* eine erheblich kürzere Inkubationszeit zukommt.

Über den agglutinierenden Antikörper, falls dieser Ausdruck überhaupt berechtigt ist, *können wir vorläufig noch nichts Bestimmtes aussagen.*

Kurt Meyer fand, daß die agglutinierende Eigenschaft gewisser Menschenseren auf Hammelblutkörperchen durch Kobragift zerstört wird, und schließt daraus auf die Lipoidnatur des Agglutinins. Unsere Versuche in dieser Richtung ergaben, daß die Reaktion mit unsensibilisierten Hammelblutkörperchen, wie wir sie anstellen, durch Kobragift nicht aufgehoben wird. Benutzt wurden je 0,1 ccm einer 0,2 proz. Kobragift-NaCl-Lösung als Zusatz zu jedem Röhrchen (*Meyer*). In einigen Fällen war sogar eine geringe, aber immerhin deutliche Verstärkung der AR. zu beobachten, besonders hinsichtlich der Schnelligkeit des Auftretens. Als natürliche Folge des Giftzusatzes trat nach längerer Zeit Hämolyse ein. Von dem von Herrn Dr. *K. Meyer* freundlichst überlassenen Kobragift tötete 0,5 mg eine Maus in 10 Minuten. Wir können nach unseren Ergebnissen die Vermutung *Meyers* über die Lipoidnatur des Agglutinins nicht beweisen, vorausgesetzt, daß es sich überhaupt um denselben Reaktionskörper handelt (s. u.).

Nachdem wir aus den Versuchen von *Landsteiner* und *H. Sachs* wissen, daß durch Einspritzung einer Mischung von Lipoiden und Serum Lipoidantikörper erzeugt werden können, möchten wir trotz der Nichtbestätigung der Resultate *Meyers* vorläufig annehmen, daß bei der Einspritzung von Pferde- bzw. Hammelserum beim Menschen *das Lipoid-Eiweißkörper-Gemisch des artfremden Serums zur Entstehung von Lipoidantikörpern Anlaß gibt,* die an der Lipoidhülle der Blutkörperchen ihren Angriffspunkt haben und dadurch die Agglutination herbeiführen. In diesem Sinne sprechen drei Versuche mit Lipoid-freigemachtem Serum, dessen Injektion beim Menschen keine AR. auslöste. Die Versuche sind noch nicht zahlreich genug, um daraus entscheidende Schlüsse ziehen zu können, daher sollen in der nächsten Mitteilung hierüber ebenfalls weitere Angaben folgen.

Zum Schluß möchten wir noch auf die in der Einleitung aufgeworfene Frage zurückkommen, ob es sich etwa bei den von uns aufgefundenen Agglutininen um heterogenetische Antikörper im Sinne *Forssmanns* handelt. Diese Frage glauben wir ohne weiteres verneinen zu können. Nach der Theorie der heterogenetischen Antikörper müßte nämlich eine Receptorengemeinschaft zwischen dem injizierten Antigen und sämtlichen Blutarten, auf die der Antikörper wirkt, vorhanden sein. Wäre dieses aber der Fall, so müßte es gelingen, mit einer Blutart auch die Agglutinine für sämtliche andere Blutarten zu entfernen, während wir an anderer Stelle gezeigt haben, daß die Absorption eine spezifische ist.

Es scheint uns demnach, daß die von uns gefundene Reaktion sich bisher *nicht* ohne Schwierigkeiten *bekannten Erscheinungen auf dem Gebiet der Immunitätslehre einreihen läßt.* Weitere Untersuchungen über den Mechanismus dieser Reaktion sind deshalb erforderlich, über die wir in unserer nächsten Mitteilung berichten werden.

Nachdem wir zunächst unbekümmert um die in der Literatur vorliegenden Angaben unsere Resultate mitgeteilt haben, wie sie sich logisch aus der Analyse der beobachteten Erscheinungen ergeben haben, wollen wir nunmehr noch erörtern, ob die von uns gefundene Reaktion zu bereits bekannten Erscheinungen in der Immunitätslehre in Beziehung steht.

Hier wäre zunächst die bereits mehrfach zitierte Arbeit von *Kurt Meyer* zu erwähnen. Unter 100 000 Seren, die auf die WaR. untersucht wurden, fanden sich 8, welche bei der Anstellung der WaR. Hammelblut agglutinierten. In 6 dieser Fälle trat die agglutinationsfördernde Wirkung des Menschenserums nur gegenüber sensibilisierten Blutkörperchen ein, und zwar sowohl bei der Verwendung von Hammelblut und seinem entsprechenden Immunserum wie bei Menschenblut und Menschenblutimmunserum, während merkwürdigerweise sensibilisiertes Rinderblut nicht stärker agglutiniert wurde als normales Rinderblut. Die Unerläßlichkeit des hämolytischen Amboceptors für das Zustandekommen der Reaktion beweist, daß es sich in diesen Fällen sicher um einen anderen Vorgang als den von uns beobachteten handelt. In 2 Fällen berichtet *K. Meyer*, daß die Agglutination auch gegenüber nichtsensibilisiertem Hammelblut eintrat. Ob es sich hierbei um die Seren von Menschen handelte, die vorher artfremdes Serum erhalten hatten, vermögen wir nicht anzugeben, da sich in der Arbeit von *Meyer* Angaben darüber nicht finden.

Nach Abschluß unserer Versuche wurde uns eine am 22. Nov. 1924 in der rumänischen Gesellschaft für Biologie von *Hanganutziu* mitgeteilte Versuchsreihe bekannt, deren Resultate sich zum Teil mit den unsrigen decken. *Hanganutziu* beobachtete in 12 Fällen nach der Injektion von Pferdeserum beim Menschen das Auftreten von Hämagglutininen für Hammelblut. Neben Hammelblut wurden auch Pferde-, Meerschweinchen-, Kaninchen-, Rinder- und Schweineblutkörperchen agglutiniert. *H.* hat auch bereits richtig beobachtet, daß das Auftreten der Reaktion nicht an das Vorhandensein klinischer Erscheinungen von Serumkrankheit gebunden ist. Eine weitere Analyse der Beobachtungen wurde von *H.* nicht versucht.

Sonstige ähnliche Feststellungen ließen sich in der Literatur nicht auffinden.

Es ergibt sich nunmehr über die von uns festgestellten Tatsachen als Zusammenfassung:

1. Bei 90 von 102 mit Pferde- resp. Hammelserum gespritzten Menschen traten im Blutserum Agglutinine für die roten Blutkörperchen fremder Tierarten auf. Geprüft wurde Hammel-, Rinder-, Pferde-, Kaninchen-, Meerschweinchen-, Schweine- und Hühnerblut. Mit Ausnahme des Hühnerblutes wurden sämtliche Blutarten weit stärker agglutiniert als von menschlichem Normalserum.

2. Die Reaktion (AR.) tritt zuerst am 7.—8. Tage nach der Injektion auf, erreicht ihr Maximum am 12.—13. Tage und ist oft noch Monate, ja in 1 Fall bis zu 1 Jahr nachweisbar.

3. Bei Arzneiexanthemen, Asthma bronchiale und anderen Überempfindlichkeitszuständen wurde die AR. nicht beobachtet.

4. Die agglutinierende Substanz wird durch die Blutkörperchen gebunden, doch vermag jede Blutart nur den für sie wirksamen Anteil der Agglutinine aus dem Serum zu entfernen (spezifische Absorption.).

5. Die AR. steht mit den Präcipitinen in keinem Zusammenhang. Nach Ausfällung der spezifischen Präcipitine aus einem Kaninchen-Rinderserum mittels Rinderserums blieb die AR. quantitativ erhalten.

6. Zur Zeit des Auftretens der AR. ist das injizierte artfremde Serum mit Hilfe des aktiven Anaphylaxieversuchs am Meerschweinchen im Menschenserum noch nachweisbar.

7. Das Antigen für die AR. ist in der Albuminfraktion des Serums enthalten und scheint in den Globulinen fast völlig zu fehlen.

8. Es wird vermutet, daß die AR. durch die Lipoide des artfremden Serums ausgelöst wird.

Literaturverzeichnis.

Arthus, Venin-Antivenin. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **77**, 268. 1914. — *Bang* u. *Overton*, Studien über die Wirkungen des Crotalusgiftes. Biochem. Zeitschr. **34**, 428. 1911. — *Besredka*, Über Anaphylaxie. Ergänzungsband zum Handbuch der Technik und Meth. der Immunitätsforschung v. Kraus-Levaditi. S. 207. — *Biedl* u. *Kraus*, Die experimentelle Analyse der anaphylaktischen Vergiftung. Ebenda, S. 255. — *Blumenthal*, Hämolyse in Oppenheimer, Handbuch der Biochemie. — *Bordet* u. *Gay*, Sur les rélations des sensibilatrices avec l'alexine. Ann. de l'inst. Pasteur **20**, 467. 1906. — *Bordet* u. *Gengou*, La coagglutination des globules rouges p. d. mélanges d'anticorps et d'antigénes albuminaux. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. 1, Orig. **58**, 330. 1911. — *Bordet* u. *Streng*, Les phénomènes d'adsorption et la conglutinine du sérum de bœuf. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **49**, 260. 1909. — *Calmette*, Les sérums antivénimeux polyvalents. Cpt. rend. des séances hebdom. de l'acad. des sciences **138**, 1079. 1902. — *Doerr*, Allergie und Anaphylaxie. In Kolle-Wassermann, Handbuch 1913. — *Doerr*, Die Anaphylaxie in Kraus-Levaditi, Handbuch Bd. 2, S. 856. — *Doerr*, Die Anaphylaxieforschung in Weichardt, Ergebn. d. Hyg., Bakteriol., Immunitätsforsch. u. exp. Therapie 1922, S. 71. — *Doerr* u. *Berger*, Immunologische Analyse der komplexen Struktur des Serumeiweißes. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 191. 1922. — *Doerr* u. *Berger*, Über das Verhältnis der Fraktionsspezifität zur Artspezifität bei den Eiweißkörpern der Blutsera. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 258. 1922. — *Doerr* u. *Berger*, Globulin und Albumin aus demselben Serum als immunisatorische Antagonisten. Biochem. Zeitschr. **131**, 13. 1922. — *Ehrlich* u. *Morgenroth*, Über Hämolyse. III. Mitt. Berlin. klin. Wochenschr. 1900, S. 453. — *Friedberger*, Die Anaphylaxie in Kraus-Brugsch, Handbuch Bd. 2, Teil 1, S. 859. — *Friedberger* u. *Jarre*, Über aspezifische präcipitierende Sera. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie **30**, 351 1920. — *Friedemann*, Die Anaphylaxie. Weichardts Jahresberichte 1911. — *Friedemann*, Über heterophile Normalambozeptoren. Ein Beitrag zur Lehre von der Entstehung der normalen Antikörper. Biochem. Zeitschr. **80**, 333. 1917. — *Forssmann*, Die Herstellung hochwertiger spezifischer Schafhämolysine ohne Verwendung von Schafblut. Biochem. Zeitschr. **37**,

78. 1911. — *Forssmann* u. *Hintze*, Die heterologe Toxizität der Antisera. Biochem. Zeitschr. **44**, 336. 1912. — *Gay* u. *Southard*, On Serum Anaphylaxis in the guinea-pig. Journ. of med. research 1907, Nr. 2. — *Georgi*, Studien über das serologische Verhalten der Hammelblutreceptoren in den Organen. Arb. a. d. Inst. f. exp. Therapie Frankf. a. M. **9**. 31. 1919. — *Hanganutziu*, Hémagglutinines hétérogénétiques après injection de sérum de cheval. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **2**, 1457. 1924. — *Hirszfeld*, *Brokman*, *Mayzner* u. *Przesmycki*, Recherches sur la Pathogénèse de la scarlatine. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **43**, 946. 1925. — *Kraus R.*, Über diagnostische Verwertbarkeit der spezifischen Niederschläge. Wien. klin. Wochenschr. 1901, S. 693. — *Kritschewsky*, Heterogene passive Anaphylaxie, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **39**, 582. 1924. — *Lamb*, Specifity of antivenomous sera. Sci. Mem. med. a. Sanit. departm. of the governm. of India **5**. 1903 u. **10**. 1904; **16**. 1905. — *Landsteiner*, Über heterogenetisches Antigen und Hapten. Biochem. Zeitschr. **119**, 294. 1921. — *Landsteiner* u. *Simms*, Production of heterogen. antibodies with mixtures of the binding part of the antigen and protein. Journ. of exp. med. **38**, 127. 1923. — *Leschly*, Versuche über Konglutination Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **25**, 219. 1916. — *Metschnikoff*, Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines. Ann. de l'inst. Pasteur **11**, 801. 1897. — *Meyer, Kurt*, Über Hämagglutininvermehrung und Hämagglutination fördernde Wirkung bei menschlichen Seren. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Terapie, Orig. **34**, 229. 1922. — *Malkoff*, Beitrag zur Frage der Agglutination der roten Blutkörperchen. Dtsch. med. Wochenschr. 1900, S. 229. — *Mauwaring*, Change in the third serum component due to exposure to corpuscles. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **45**, 55. 1907. — *Nowotny* u. *Schick*, Homologe und heterologe passive Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **3**, 671. 1909. — *Nutall*, Experiments upon the new specific test for blood. Brit. med. journ. 1901, S. 1141. — *Otto*, Zur Frage der Serum-Überempfindlichkeit. Münch. med. Wochenschr. 1907, S. 1665. — *v. Pirquet* u. *Schick*, Die Serumkrankheit. Wien 1905. — *Rothacker*, Präcipitation bei Fleischvergiftung, nebst Beobachtung über Auftreten von Hämolysinen gegen Hammelblutkörperchen in Paratyphus-B-Gärtner-Antiseris. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **16**, 491. 1913. — *Sachs*, Antigene tierischen Ursprungs. In Kraus-Levaditi, Handbuch Bd. 1, S. 244. — *Sachs*, Tierische Toxine als hämolytische Gifte. Biochem. Zentralbl. **5**, 257. 1906. — *Sachs* u. *Klopstock*, Lipoidantikörperbildung und syphilitische Blutveränderung. Dtsch. med. Wochenschr. 1926, S. 650. — *Sachs*, *Klopstock* u. *Weil*, Die Entstehung der syphilitischen Blutveränderung. Dtsch. med. Wochenschr. 1925, S. 589. — *Sachs*, *Klopstock* u. *Weil*, Die Reaktionsfähigkeit des Organismus gegenüber Lipoiden. Dtsch. med. Wochenschr. 1925, S. 1017. — *Sachs*, *Klopstock* u. *Weil*, Zur Frage der künstlichen Erzeugung der für Syphilis charakteristischen Blutveränderung beim Kaninchen. Klin. Wochenschr. 1926, S. 928. — *Stephens*, The hemolyt. action of snake toxins and toxic sera. Journ. of pathol a. bacteriol. **6**, 273. 1900. — *Schiff*, Agglutination. Oppenheimer, Handbuch der Biochemie Bd. 3, S. 336. 1925. — *Streng*, Über das Vorkommen des Konglutinins in dem Serum verschiedener Tiere, insbesondere der Wiederkäuer. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **2**, 415. 1909. — *Uhlenhuth*, Neuer Beitrag zum spezifischen Nachweis von Eiweiß auf biologischem Wege. Dtsch. med. Wochenschr. 1900, S. 734. — *Weil*, Experimentelle Grundlagen der Antikörperbildung gegen arteigene Lipoide. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **46**, 81. 1926. — *Yamanouchi*, Expériences d'anaphylaxie chez l'homme et le singe. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **62**, 1000. 1910.

(Aus dem „Institut für Kolloidforschung“ zu Frankfurt a. M.)

Erfahrungen mit der Goldverstärkungsmethode zur Sichtbarmachung ultravisibler Gebilde.

Von
H. Bechhold und **Stanislaw Sierakowski.**

Mit 4 Textabbildungen.

Vor kurzem haben *Bechhold* und *Villa*[1]) eine Methode beschrieben, um subvisible Gebilde von beliebiger Kleinheit dem Auge im Ultramikroskop sichtbar zu machen. Es handelt sich also um Gebilde, die kleiner sind als Bakterien, bis herunter zu Albuminmolekularaggregaten von den Dimensionen 4—10 $\mu\mu$. Unsere weiteren Erfahrungen mit dieser Methode wollen wir nachstehend wiedergeben.

Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß die zu untersuchende Flüssigkeit zunächst durch eine Kerze filtriert wird, um sie von mikroskopisch im Hellfeld sichtbaren Gebilden zu befreien[2]). Alsdann wird sie auf einem Ultrafiltertiegel nach *Bechhold-König* ausgewaschen, um Eiweiß und Eiweißabbauprodukte zu beseitigen. Der Rückstand im Ultrafiltertiegel wird durch Goldchlorid vergoldet und das Goldchlorid ausgewaschen. Der nun im Ultrafiltertiegel zurückbleibende Rückstand wird auf einem Objektträger verascht und durch eine besondere Goldlösung verstärkt.

Die Wiederholung der Versuche von *Bechhold* und *Villa* mit *Coli-Bakteriophagen* bestätigte die früheren Ergebnisse und ergab manche Verbesserungen, die für die Technik der Ausführung nicht ohne Wert sind.

Die Ultrafiltermembran. Bechhold und *Villa* überziehen die Tiegel mit einer Schicht Eisessigkollodium, die den Bakteriophagen ganz

---

[1]) *Bechhold* und *Villa*, Biochem. Zeitschr. **165**, 250—260. 1925; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 601—613. 1926. — *Bechhold*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig., Beiheft zu Band 97, S. 162 bis 164.

[2]) Die benutzte Kerze zeigte bei der Luftdurchblasprobe bei 0,6 Atm. 10—20 Stellen, an denen Luft durchperlte. Die größten Poren haben somit einen Durchmesser von rund 5 μ. Diese wären also hinreichend groß, um auch mikroskopisch sichtbare Gebilde durchzulassen. Wenn das Hellfeld trotzdem leer bleibt, so beweist dies, daß die Kerze in der Hauptsache als Adsorptionsfilter wirkt.

oder bis auf Spuren zurückhält. Es läßt sich leicht einrichten, daß im Filtrat nicht mehr als etwa 1/1000 der Bakteriophagenmenge ist, welche im Rückstand bleibt. Dies gelingt im allgemeinen mit einer 2,5—4 proz. Eisessigkollodiumlösung.

Es empfiehlt sich, eine Eisessigkollodiumlösung zu verwenden, die einige Monate alt oder künstlich gealtert ist. Mit höherem Alter nimmt nämlich die Viscosität der Lösung rapid ab. Dies hat zur Folge, daß man mit einer älteren Eisessigkollodiumlösung weit dünnere Membranen erhält, die für Wasser viel durchlässiger sind und daß trotzdem ihre Siebwirkung etwas die gleiche bleibt. Nachstehender Versuch, welcher von *E. Heymann* vorgenommen wurde, mag dies erläutern: Eine 10proz. Eisessigkollodiumlösung wurde mit Eisessig soweit verdünnt, daß sie 7,5% Kollodiumwolle in Lösung enthielt. Vermittels eines Viscosimeters wurde von Zeit zu Zeit die Auslaufzeit eines gleichen Volumens der Lösung bestimmt.

Alter ab Verdünnung	Auslaufzeit	Prozent
0 Tag	13 Min. 15 Sek.	100
1 „	13 „ 3 „	98
3 Tage	13 „ 10 „	99
5 „	13 „ 25 „	102
8 „	13 „ 3 „	98
18 „	11 „ 25 „	87
30 „	9 „ 50 „	75
46 „	7 „ 10 „	59
71 „	6 „ 3 „	45
83 „	4 „ 52 „	37

Die mit dieser Lösung erzielten Membranen waren sowohl zu Beginn, wie auch nach 83 Tagen dicht gegen *Albumin* (Biuretprobe und Sulfosalicylsäure). Die Durchlaufgeschwindigkeit *für Wasser* betrug aber bei der Membran aus frischer Eisessigkollodiumlösung 220 ccm, mit der 83 Tage alten 280 ccm bei gleicher Fläche und 70 cm Hg Unterdruck.

Zwecks *künstlicher Alterung* erhitze man die Eisessigkollodiumlösung 2½ *Stunden lang auf 90 bis 98°* auf dem Wasserbad. Abweichung von dieser Vorschrift nach unten bedingt ungenügende Alterung, nach oben zu große Durchlässigkeit, wie nachstehende Daten erweisen:

Zeit der Erwärmung	Temperatur	Auslaufzeit bei 20°	Durchlaufzeit der Membran für Wasser pro Stunde	Eigenschaft der Membran
0 Std.	—	9 Min. 53,6 Sek.	220 ccm	eiweißdicht
2½ Std.	90—98°	1 Min. 53 Sek.	290 ccm	eiweißdicht
6 Std.	65—70°	7 Min. 2 Sek.	—	—
0 Std.	—	8 Min. 47 Sek.	—	—
6 Std.	100°	0 Min. 30 Sek.	200 ccm	nicht ganz eiweißdicht

Doch auch die Tiegel selbst sind nicht ganz gleichmäßig durchlässig und sind ihrerseits die Ursache für nicht ganz gleichmäßig dichte Membranen. Wir haben deshalb die Membranen stets in der Weise geprüft, daß wir 0,5 cc normales Serum mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 20fache verdünnten. Diese verdünnte Serumlösung filtrierten wir durch eine Chamberlandkerze und wuschen sie mit optisch leerem Wasser aus. Das Ultrafilter mußte nun so beschaffen sein, daß es für den Bakteriophagen fast ganz oder ganz undurchlässig, für Serumeiweiß dagegen leicht durchlässig war. Wurde die Lösung in Tiegeln mit optisch leerer Kochsalzlösung und zum Schluß mit doppelt destilliertem, optisch leerem Wasser gewaschen, so durfte weder im Tiegel noch im Waschwasser mehr eine Spur von Eiweiß mit Sulfosalicylsäure nachweisbar sein. Die Membran sollte für diese Versuche so beschaffen sein, daß bereits im ersten Ultrafiltrat 50% des Eiweiß passiert. Ist die Membran dichter, so zeigen sich nach der Vergoldung viele kleine Teilchen, während man andernfalls optisch leere Präparate erhält.

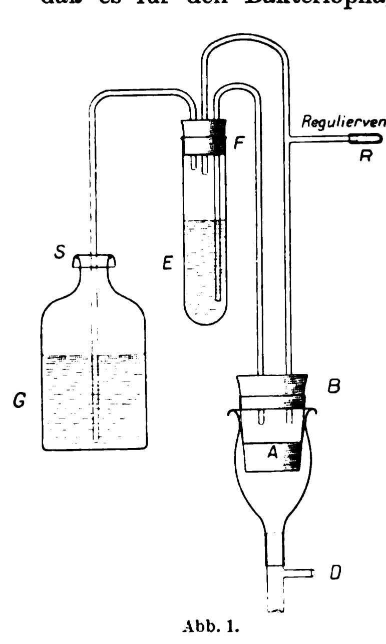


Abb. 1.

Da das Auswaschen sehr zeitraubend ist und viel Aufmerksamkeit erfordert, so hat der eine von uns (*Sierakowski*) eine kleine Apparatur konstruiert, durch die es möglich ist, vollkommen *automatisch* den verschlossenen Filterinhalt *zu waschen*. *A* ist der *Bechhold-König*sche Ultrafiltertiegel, welcher wie üblich mit Gummidichtung auf einer Glastulpe und Saugflasche sitzt. Dieser ist mit einem Gummipfropfen *B* luftdicht verschlossen, in den 2 Röhren enden. Das optisch leere Wasser befindet sich in der Vorratsflasche *G*. Wird an der Saugflasche *D* gesaugt, so tritt Wasser aus dem Vorratsgefäß *G* in den kleinen Behälter *E*, von dem aus es durch die Röhre *F* in das Ultrafilter überfließt. Es kommt nun nur darauf an, die Luftmenge in den Gefäßen *A* und *E* ein für allemal so einzustellen, daß die Heberwirkung über das Rohr *F* regelmäßig funktioniert. Dies erfolgt vermittels des Regulierventils *R*. An dem Seitenrohr *R* befindet sich ein Gummiverschluß, den man zu diesem Zweck abnimmt und saugt, bis Wasser aus *E* nach *A* übertritt. Verschließt man alsdann *R*, so erfolgt die Spülung vollkommen automatisch. Während die Flüssigkeit

aus *A* wegfiltriert, füllt sich der Zwischenbehälter *E* und entleert sich, sobald er voll ist, auf einmal durch das Rohr *F* in den Tiegel *A*.

Den Vorratsbehälter *G* bedeckt man mit einer Stanniolkappe *S*.

Die Lösungen: Sowohl die *Goldchlorid-* als auch die *Ferricyankaliumlösung* sind im Lichte nicht haltbar. Läßt man die Goldchloridlösung einige Tage in diffuser Beleuchtung stehen, so sieht man mindestens zahlreiche Goldteilchen im Mikroskop. Oft kann man sogar mit dem bloßen Auge an der Glaswand einen hauchartigen Goldspiegel erkennen. Im Dunkeln hält sich die Lösung weit länger. Vor Benutzung ist deshalb die Lösung stets auf optische Leere zu prüfen.

Die n/1000 Ferricyankaliumlösung weist nach einigen Tagen beim Stehen im Licht bereits mit bloßem Auge eine Trübung auf; eine solche Lösung ist auch nicht mehr imstande, die Bildung neuer Goldkeime zu unterdrücken. Es empfiehlt sich deshalb, die Lösung im Dunkeln aufzubewahren und sie alle paar Tage frisch herzustellen.

Die Zinnchlorürlösung, zum Nachweis von Gold, gibt die feinsten und sichersten Resultate, wenn sie möglichst frisch ist.

Das Glycerin, welches zur Immersion dient, ist ebenfalls auf optische Leere zu prüfen. Erweist es sich als nicht optisch leer, so ist es durch ein 4 proz. Eisessigkollodiumfilter zu filtrieren.

Die Objektträger sind vor dem Gebrauch in Chromschwefelsäure zu kochen und mit optisch leerem Wasser zu spülen, dann, vor Staub geschützt, zu trocknen. War die Oberfläche der Objektträger fettig, so empfiehlt sich, den Objektträger 15—20 mal durch eine Bunsenflamme zu ziehen. Abwischen der Objektträger mit Reispapier ist nicht empfehlenswert, da von dem Reispapier zuweilen Teilchen auf dem Objektträger festhaften.

Unter den so gereinigten Objektträgern erweisen sich aber viele als unbrauchbar, da sie nicht optisch leer sind. Bei einer Durchprüfung gewöhnlicher Objektträger erwiesen sich etwa $^2/_3$ als unbrauchbar. Hingegen haben sich Objektträger aus Uviolglas des Jenaer Glaswerkes Schott & Gen. als recht geeignet erwiesen; nur ist der hohe Preis etwas hinderlich. Sie müssen jedoch ebenfalls auf optische Leere geprüft und sortiert werden. Auch Objektträger aus Quarz sind meist optisch leer, doch fällt hier die Preisfrage noch mehr ins Gewicht.

Jedenfalls ist es notwendig, *jeden* Objektträger vor Benutzung auf optische Leere zu kontrollieren.

Versuche mit Bakteriophagen.

Bei Berücksichtigung der oben erwähnten Kautelen, erhielten wir Bilder von Bakteriophagen, welche die in der zitierten Veröffentlichung abgebildeten einheitlichen gelblichen Scheibchen enthalten. Andere Gebilde waren nicht zu sehen.

Versuche mit Normalsera.

Es galt uns festzustellen, ob in Normalsera außer den mikroskopisch sichtbaren Formen auch subvisible Gebilde vorhanden sind. Zu diesem Zweck wurden im ganzen 10 Normalsera untersucht; 8 davon stammten von neugeborenen Kindern, 2 von Erwachsenen. Die Sera wurden, wie früher beschrieben, durch Kerzen filtriert und auf einem Ultrafilter mit optisch leerer, physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, wie es den geforderten Bedingungen genügte (50% Eiweißdurchlässigkeit im ersten Filtrat). Alsdann wurde in der geschilderten Weise ausgewaschen und der eventuelle Rückstand im Ultrafiltertiegel vergoldet und wieder ausgewaschen. Vor Entnahme der Probe soll man den Ultrafiltertiegel gut rühren, da eventuell Teilchen an den Wänden kleben. Die so behandelten und vergoldeten Sera wurden alsdann auf den Objektträger gebracht und in der bekannten Weise verstärkt. Sämtliche Präparate von Normalmenschensera erwiesen sich als *optisch leer.*

Es wurde auch eine Blutprobe untersucht, welche 2 Stunden nach einer *fettreichen Nahrung* (100 g Butter) entnommen war. Das Serum von dieser Blutprobe war sehr trübe. Wurde es unter üblichem Druck durch die Kerze filtriert, so erhielt man ein trübes Filtrat. Nahm man jedoch die Filtration unter *geringem Druck*[1]) vor, so erhielt man ein klares Filtrat, das sich auch nach der weiteren Behandlung, Vergoldung und Verstärkung, als *optisch leer* erwies. — Sera mit Hämoglobin eignen sich nicht zur Prüfung, weil Hämoglobin von Ultrafiltern zurückgehalten wird, die Albumin durchlassen.

Peripneumonie der Rinder.

Einer Anregung von Geh. Rat *Kolle* folgend untersuchten wir dieses Virus. Vom *Reichsgesundheitsamt* Berlin sowie von Herrn Geh. Rat Prof. Dr. *Frosch* erhielten wir Kulturen von Peripneumonie der Rinder, für deren Überlassung wir an dieser Stelle verbindlichst danken möchten. Die glasig durchscheinenden Kolonien auf Agar sind, wie bekannt, mit dem bloßen Auge deutlich erkennbar[2]). Die Kultur auf flüssigem Nährboden weist Opaleszenz mit Schlierenbildung beim Schütteln auf. Im gewöhnlichen Mikroskop bei Hellfeld läßt sich kaum etwas erkennen, auch nicht nach Färbung. Hingegen zeigt ein Tropfen der Kultur, ungefärbt, bereits im Ultramikroskop zahlreiche, bläschenförmige Einzelteilchen, die in lebhafter, wahrscheinlich *Brown*scher Bewegung sind. Ähnliche Gebilde nimmt man im Filtrat einer

[1]) Vgl. *Bechhold*, Kolloide in „Biologie und Medizin", 4. Aufl., S. 16. *Bechhold* und *Neuschloß*, Kolloid-Zeitschr. **29**, 81 ff. 1921.

[2]) Vgl. die zusammenfassende Darstellung von *Cl. Giese* in „Seuchenbekämpfung", Heft 6, 1925.

Aufschwemmung wahr, die durch eine Kerze filtriert ist. Bringt man das auf flüssigem Nährboden gezüchtete Peripneumonievirus auf ein $2^1/_2$ proz. Ultrafilter und wäscht erst mit physiologischer Kochsalz-

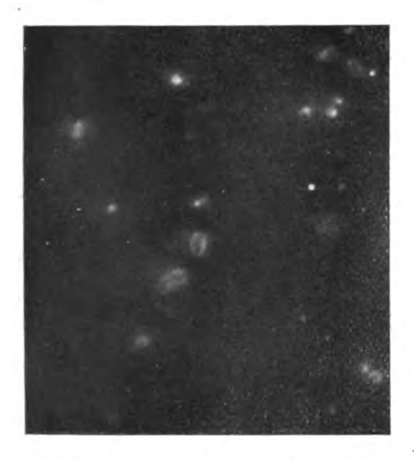


Abb. 2. Peripneumonie. Kerzenfiltrat, nicht vergoldet.

Abb. 3. Peripneumonie vergoldet, aber *nicht* verstärkt.

lösung, dann mit Wasser aus, so erweist sich der Rückstand als trübe. Betrachtet man ihn im Ultramikroskop, so nimmt man neben Einzelteilchen viele Haufen wahr. Es rührt dies vielleicht daher, daß durch die Ent-

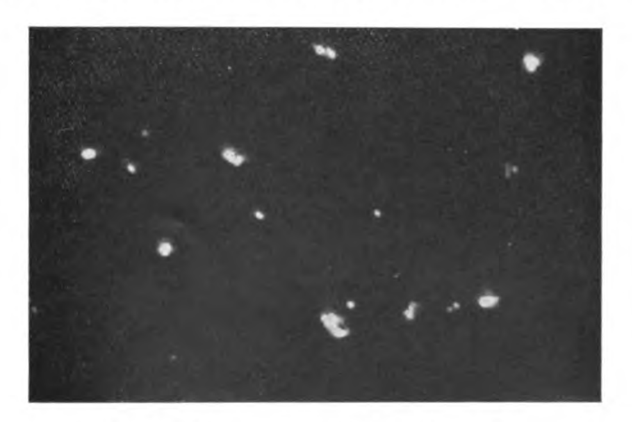


Abb. 4. Peripneumonie vergoldet und verstärkt.

fernung der Salze und des Serums eine Agglutination eintritt. Diese Haufen sind so groß, daß man sie im gewöhnlichen Mikroskop, wenn sie sich färben ließen, leicht wahrnehmen müßte. Es sind also die optischen Brechungsverhältnisse, welche die Sichtbarkeit im Mikroskop hindern.

Behandelt man eine solche Peripneumoniekultur mit Goldchlorid, wäscht auf dem Ultrafilter aus und verascht, so sieht man im Hellfeld nichts; im Ultramikroskop sind dann die Bläschen mit ihren charakteristischen dunkeln (Interferenz-?) Strukturen viel heller. Verstärkt man, so sieht man im Hellfeld winzige schwarze Pünktchen, im Dunkelfeld intensiv strahlende Gebilde (vgl. Abb. 2—4).

Die hier beschriebenen Formen gleichen ganz denen, die *Frosch* beschreibt und die er im ultravioletten Licht photographierte. Auch kann man manche der Formen wiedererkennen, die *Barnard*[1]) in seinen Untersuchungen über die Aufnahmen von filtrierbarem Virus im ultravioletten Licht beschreibt[2]).

Ein Bericht über Versuche mit P. M. *Kulturen* aus *Pflanzencarcinomen*, die von Prof. Dr. *Blumenthal* zur Verfügung gestellt wurden, sollen einer späteren Veröffentlichung vorbehalten bleiben.

---

[1]) Lancet v. 18. VII. 1925.

[2]) *Barnard* gibt dort schematische Bilder von Gebilden, die er in Kulturen von Peripneumonie wahrnahm. Dieselben haben eine merkwürdige Ähnlichkeit mit Bildern von hämolysierenden Erythrocyten, wie sie der eine von uns (*Bechhold*) in der Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 5, veröffentlicht hat. Es sei hier darauf hingewiesen, ohne zunächst weitergehende Schlußfolgerungen daraus zu ziehen.

(Aus dem Institut „Robert Koch". — Abteilung: Prof. *O. Schiemann*.)

Versuche über den Einfluß vitaler Speicherung auf die Anaphylaxie.

Von

Dr. Hans Meyer,
Assistenten am Institut.

Im Anschluß an die Versuche, in denen wir nach dem Vorgang von *Bieling* und *Isaac* bei Mäusen den Einfluß von Injektionen vitalgespeicherter Kolloide auf die Entstehung der aktiven Immunität und der Antikörper gegen Pneumokokken untersucht haben, soll im folgenden über analoge Versuche auf dem Gebiete der Serumüberempfindlichkeit berichtet werden. Eine vorläufige Mitteilung darüber hat *Neufeld* gelegentlich eines Vortrages (Sitzungsbericht der Berl. Ges. f. Mikrobiologie vom 15. XII. 1924, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenkunde und Infektionskrankh., Abt. I, Ref. 78, Nr. 17/18, S. 429) bereits erstattet. Danach gelang es uns weder bei Mäusen noch bei Meerschweinchen, die Entstehung der Überempfindlichkeit durch vorhergehende Blockade mit Eisenzucker in gelegentlicher Kombination mit Milzexstirpation zu verhindern, während wir in früheren Versuchen bei Anwendung derselben Maßnahmen die Entstehung der Pneumokokkenimmunität bei Mäusen unterbinden konnten; wir fügten damals hinzu, daß beim Meerschweinchen die Möglichkeit einer genügenden Blockade, d. h. einer solchen, die die Bildung von Immunstoffen verhindert, noch nicht erwiesen sei, während bei Mäusen bekanntlich die Erzeugung einer Anaphylaxie relativ schwer gelingt, so daß man dazu recht große Mengen von Antigen injizieren muß. Wir ließen danach die Frage, ob die Entstehung des anaphylaktischen Reaktionskörpers durch Ausschaltung größerer Teile des R. E. zu verhindern sei, noch offen. Dagegen konnten wir in Bestätigung der Versuche von *Moldovan* und *Zolog* u. a. bei schon sensibilisierten Tieren durch intravenöse Injektion von Tusche die Auslösung des anaphylaktischen Schocks unterbinden.

1. Versuche, durch eine der Sensibilisierung vorausgehende Blockade die Entstehung der Anaphylaxie zu verhüten.

Bevor wir unsere eigenen Versuche besprechen, seien folgende Beobachtungen anderer Autoren wiedergegeben.

Positive Ergebnisse erzielten *Mautner* und *Luzzato* durch Entmilzung allein ohne Blockade. *Mautner* konnte bei Hunden durch Milzexstirpation vor oder im Beginn der Sensibilisierung die Auslösung des anaphylaktischen Schocks verhindern; er sieht die Ursache dafür, daß dies ihm nicht in allen Fällen gelang, in vikariierender Funktion des übrigen R. E. *Luzzato* fand das gleiche bei Meerschweinchen, wenn er die Milz in dem Zeitraum von 18 Tagen vor bis 5 Tagen nach der Sensibilisierung exstirpierte.

Über negative Resultate berichtet dagegen neuerdings *Tich.-V. Simitch*, der versucht hat, durch eine der Sensibilisierung vorausgehende Blockade, zum Teil kombiniert mit Milzexstirpation, die Beziehungen zwischen R. E. und dem Auftreten der Anaphylaxie zu klären. Er blockierte Meerschweinchen, von denen einige 8 Tage zuvor entmilzt waren zum Teil mit Eisenzucker (Gesamtdosis 4 ccm 6proz. Lösung iv. in 2 Injektionen innerhalb 2 Stunden), zum Teil mit Tusche (Gesamtdosis 4 ccm 3proz. Lösung iv. in 4 Injektionen à 1 ccm). Alle Tiere wurden am folgenden Tage nach der Blockade sensibilisiert mit 0,2 ccm Rinderserum sc., also einer erheblich großen Dosis, und 20 Tage später iv. mit 0,1 ccm Rinderserum geprüft. Alle so behandelten Tiere starben ebenso wie die Kontrolltiere im anaphylaktischen Schock, ohne erkennbare Abweichung von den typischen Symptomen. Auch die Tiere, die zuerst entmilzt und dann blockiert wurden, starben gleicherweise. Verf. schließt aus seinen Ergebnissen, daß „das R. E. nicht beteiligt ist an dem anaphylaktischen Schock“.

Hier seien auch die Versuche von *Zolog* genannt, der bei Verfütterung von vitaminarmer Kost während 30 Tagen vor der Sensibilisierung und weiteren 15 Tagen bis zur Reinjektion bei Meerschweinchen die Dosis letalis minima von Pferdeserum 8mal so groß als bei mit vitaminhaltiger Kost ernährten Kontrolltieren fand; die mit vitaminarmer Kost gefütterten Tiere werden also schwächer sensibilisiert.

Bei der Besprechung unserer eigenen Versuche verzichten wir auf die Aufzählung sämtlicher (nichtblockierter) Kontrolltiere und erwähnen nur diejenigen Kontrollen, die an der austitrierten kleinsten Serumdosis im anaphylaktischen Schock eingingen; das ist zugleich die Dosis, die wir bei den blockierten Tieren anwendeten. Zur Sensibilisierung wie zur Reinjektion haben wir stets frisches, abgesetztes, nichtinaktiviertes Pferdeserum benutzt. Die zur Blockade verwendeten kolloidalen Lösungen wurden in Aq. dest. angesetzt und stets frisch hergestellt. In sämtlichen Versuchen wurden Meerschweinchen von ungefähr 250 g und Mäuse von ungefähr 17 g verwendet. Alle Versuchstiere gelangten zur Sektion; die den Schock überlebenden wurden 24 Stunden nach der Reinjektion getötet und seziert.

Die Versuche N. 3, 7 und 10 wurden von dem ehemaligen Assistenten am Institut, Herrn Dr. *Killian*, ausgeführt.

a) *Versuche an Mäusen.*

Versuch 1. 5 Mäuse, dazu Kontrolltiere wurden nach den Angaben von *Ritz* mit 2 Injektionen Pferdeserum (0,3 ccm ip. und nach 72 Stunden 0,5 ccm ip.) sensibilisiert. 24 Stunden vor der ersten und 24 Stunden vor der zweiten Sensibilisierung erhielten die 5 Tiere je 0,3 ccm einer 20proz. Eisenzuckerlösung iv. Am 12. Tage nach der

2. Sensibilisierung wurden sie geprüft mit der bei den Kontrolltieren als Dosis letalis minima ermittelten Menge von 0,5 ccm iv.

Erfolg: Blockierte Tiere 5 : 0[1]) (durchschnittlich tot in 40 Min.), Kontrollen 2 : 0 (durchschnittlich tot in 40 Min.)

Sektionsbefund: Milz, Leber, Darm makroskopisch gespeichert, d. h. verfärbt, Lungen bei 3 Tieren ebenfalls.

Lungen hyperämisch, auch bei Kontrollen; Emphysem nicht erkennbar.

Versuch 2. 4 Mäuse erhalten Tusche 0,2 ccm Verd. 1 : 3 iv.; 8 Mäuse erhalten Trypanblau 0,2 ccm 1% iv.; 4 Mäuse erhalten Lithioncarmin 0,4 ccm (2,5%) iv. in 2 Injektionen im Abstand von 48 Stunden; 3 Mäuse erhalten Lithioncarmin (0,25%), gemischt mit Trypanblau (1%) (im Verhältnis 1 : 2) 0,3 ccm iv.

Diese Tiere werden nach 17 Tagen einschließlich Kontrollen mit 0,3 ccm ip. und nach weiteren 72 Stunden mit 0,5 ccm ip Pferdeserum sensibilisiert und nach weiteren 12 Tagen zugleich mit 3 Kontrolltieren mit 0,5 ccm iv. Serum geprüft.

Erfolg: Bei Tusche 4 : 2 (durchschnittlich tot in 20 Min.); bei Trypanblau 8 : 5 (durchschnittlich tot in 24 Min.); bei Lithioncarmin 4 : 3 (durchschnittlich tot in 20 Min.); bei Lithioncarmin-Trypanblau 3 : 1 (durchschnittlich tot in 30 Min.); Kontrollen 3 : 0 (durchschnittlich tot in 24 Min.)

Sektionsbefund: Makroskopisch bei einigen überlebenden Tieren, aber auch bei einigen gestorbenen blockierten Tieren Speicherung der Lungen; bei allen Tieren aber Speicherung mindestens eines Organes noch (nach 32 Tagen) deutlich erkennbar; ausgenommen Nieren und besonders Halslymphknoten und Haut, die nur bei Anwendung von Trypanblau noch makroskopisch sichtbare Speicherung zeigten. Bei Lithioncarmin war die Färbung am wenigsten deutlich sichtbar. Lungen bei allen gestorbenen Tieren hyperämisch, dagegen Emphysem oder Lungenstarre nicht vorhanden.

Hiernach hat die vorhergehende Blockade mit Eisenzucker bei Mäusen keinen Einfluß, die Blockade mit den übrigen Kolloiden (Versuch 2) in über der Hälfte der Fälle (11 von 19) dagegen den Erfolg gehabt, daß der tödliche Schock ausblieb.

b) *Versuche an Meerschweinchen.*

Versuch 3 (Dr. *Killian*). 4 Meerschweinchen wurden entmilzt und nach 24 Stunden zugleich mit 8 weiteren Meerschweinchen mit 2—3 ccm 6 proz. Eisenzucker iv. (zumeist durch Injektion in die Jugularis) blockiert. 24 Stunden später wurden alle, dazu Kontrolltiere, sensibilisiert mit 0,01 ccm Pferdeserum (im Volumen von 0,2 ccm mit NaCl, 1 Injektion) subcutan. Die Prüfung sämtlicher Tiere geschah am 21. Tage nach der Sensibilisierung, und zwar durch iv. Injektion (meist jugular) von 0,4 ccm Serum, als Dosis letalis minima bei den Kontrollen austitriert.

[1]) 5 : 0 bedeutet: Von 5 Tieren überlebt keins.

Erfolg: Entmilzte und blockierte Tiere 4 : 0 (durchschnittlich tot in 3 Min.); blockierte Tiere 8 : 0 (durchschnittlich tot in 3 Min.); Kontrollen 7 : 0 (durchschnittlich tot in 3 Min.)

Sektionsbefund: Makroskopisch bei 2 Tieren Speicherung der Lungen, bei mehreren Tieren Speicherung auch anderer Organe noch erkennbar. In allen Fällen deutliches Emphysem.

Versuch 4. Bei 2 Meerschweinchen wurde die Milz exstirpiert. 24 Stunden danach erhielten sie sowie gleichzeitig 6 nichtentmilzte Tiere eine Injektion von 1 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) intrajugular, und nach weiteren 24 Stunden wurden alle, dazu Kontrolltiere, mit 0,01 ccm Pferdeserum s. c. wie im vorigen Versuch sensibilisiert. Die Nachprüfung erfolgte am 21. Tage nach der Sensibilisierung mit 0,03 ccm Pferdeserum (im Volumen von 0,5 mit NaCl) durch Injektion in die Jugularis der Gegenseite; 0,02 ccm zur Reinjektion war bei 2 Kontrolltieren ohne sichtbaren Einfluß.

Erfolg: Entmilzte und blockierte Tiere 2 : 1 (1 Tier tot in 3 Min.); blockierte Tiere 6 : 3 (3 Tiere durchschnittlich tot in 3 Min.); Kontrollen 3 : 0 (durchschnittlich tot in 4 Min.).

Von den 4 geschützten, überlebenden Tieren waren bei 3 Tieren leichte anaphylaktische Symptome zu beobachten, bei 1 Tier zeigten sich nach Reinjektion keinerlei anaphylaktische Symptome.

Sektionsbefund: Bei den gestorbenen blockierten Tieren durchweg ausgesprochenes Lungenemphysem; die Sektion der überlebenden Tiere ergibt übereinstimmend in allen Fällen fehlendes Emphysem. Die Lunge und die übrigen Organe mit gelegentlicher Ausnahme der Milz und meistens der Niere zeigen bei den überlebenden wie bei den gestorbenen Tieren stets noch mehr oder weniger deutliche Speicherung der 22 Tage zuvor injizierten Tusche.

Hiernach hat die vorhergehende Injektion von Eisenzucker auch bei Meerschweinchen den Eintritt der Überempfindlichkeit bzw. des anaphylaktischen Todes nicht verhütet, wohl aber Tusche in der Hälfte der Fälle (4 von 8).

Wenn *Simitch* nur negative Erfolge in seinen Versuchen mit Tusche aufzuweisen hat, so beruht das vermutlich auf seiner relativ großen Sensibilisierungsdosis, 0,2 ccm, und vor allem auf der geringen Menge von 4 ccm 3proz. Tusche (in unserem Versuch am Meerschweinchen 1 ccm 50proz. Tusche), abgesehen von der möglicherweise abweichenden Beschaffenheit der Tusche.

2. Versuche, bei schon sensibilisierten Tieren durch nachträgliche Blockade die Auslösung des anaphylaktischen Schocks zu verhindern.

Derartige Versuche sind bereits von mehreren Autoren mitgeteilt und in verschiedener Weise gedeutet worden.

Petersen, Jaffe, Lewinson und *Hughes* konnten durch mehrtägige Injektionen von Eisenzucker bei mit Eiereiweiß sensibilisierten Hunden die Auslösung des Schocks verhindern. Verff. führen diesen Einfluß zurück entweder auf wirkliche Blockade des Endothels, wodurch dieses undurchlässig würde, oder darauf, daß die

Funktion (Aktivität) der Endothelien gesteigert werde, so daß sie das Antigen schneller zerstören.

Duprez gelang es, durch intravenöse Injektion von Lipoiden bei zuvor sensibilisierten Meerschweinchen die Auslösung des Schocks zu verhindern.

Ferner hat *Siegmund*, allerdings ohne anzugeben, ob vor oder nach der Sensibilisierung blockiert wurde, welche Tierart und welches Kolloid zur Speicherung benutzt wurde, mitgeteilt, daß „bei sensibilisierten, milzlosen und hochgespeicherten — blockierten — Tieren die Auslösung des anaphylaktischen Schocks nicht zu erzielen sei".

Vor allem aber sind hier die Versuche von *Moldovan* und *Zolog* anzuführen. Diese Autoren konnten bei mit 0,1 ccm Pferdeserum subcutan sensibilisierten Meerschweinchen durch intravenöse Injektion von 0,25 ccm Tusche mit gleichen Teilen Aq. dest. am 20. Tage (nach Sensibilisierung) gegen die bei Kontrolltieren als Dosis letalis minima austitrierte Menge von 0,002 iv. reinjizierten Pferdeserums und sogar gegen die 2,5—4fache Dosis schützen, und zwar gelang diese Blockade des anaphylaktischen Schocks, wenn die Reinjektion 1 Stunde bis 15 Tage nach der Tuscheinjektion erfolgte; nicht aber, wenn bereits 8 Min. nach der Blockierung reinjiziert wurde. Die mit der Dosis letalis minima geprüften Tiere zeigten keinerlei anaphylaktische Symptome, andererseits wurde bei den die 2,5—4fache Dosis letalis minima überlebenden ein modifizierter passagerer Schock und bei den infolge noch größerer Dosis im Schock sterbenden blokkierten Tieren ein wesentlich anderer Ablauf des Schocks beobachtet; in beiden Fällen standen weder Bronchospasmus noch Krämpfe im Vordergrund; es kam zu einem protrahierten Schock, allerdings mit Dyspnöe, aber ohne Atemstillstand. Bei der Autopsie fand sich keine Lungenstarre, kein Emphysem, dagegen schien die Leber stark hyperämisch und ödematös.

Verff. führen die Wirkung der Blockade zurück auf die Speicherung der Tuschepartikel in den Endothelzellen der Leber, die ihrerseits nun eine Substanz sezernieren, die die Sensibilität der Bronchialmuskulatur reduzieren soll, und zwar sowohl gegenüber Pferdeserum als auch gegenüber Histamin. Bei makroskopischem Vergleich der Organe fanden sie Speicherung der Tusche, hauptsächlich in Haut, Leber, Milz und Knochenmark; dagegen schienen Lungen und Nebenniere frei bzw. nur schwach grau; histologische Untersuchung ergab Speicherung der Tusche in den Leberendothelien, in der Milzpulpa; dagegen waren die Endothelien in den Lungen frei von Tusche, vielmehr fand sich Tusche in geringfügiger Menge im Lumen der Capillaren oder frei im Gewebe der Lunge.

Des weiteren haben *Pico*, allerdings ohne Kontrolltiere, und später *Klopstock* durch iv. Injektion von Manganchlorür einige Minuten bzw. Stunden vor der Reinjektion den tödlichen Schock verhüten können, und zwar noch bei 2facher dosis letalis minima des Antigens (*Klopstock*). *Klopstock* hat bei allen überlebenden und mit Mangan behandelten Tieren trotzdem meist typische anaphylaktische Symptome beobachtet. Er erklärt die Wirkung des Mangans als eine Abstoßung von zellständigen Antikörpern in das Blut, wodurch eine teilweise Absättigung des Antigens mit Antikörpern zustande kommt und die anaphylaktische Reaktion, wenn nicht ganz verhindert, so doch gedämpft wird.

Nach *Steppuhn*, *Zeiss* und *Brychonenko* soll Bayer 205 — dem reinjizierten Antigen (Milch) zugefügt — den anaphylaktischen Schock mit Milch sensibilisierter Meerschweinchen verhindern.

Schmidt bestätigte diese Beobachtung und fand bei Analyse dieses Versuches, daß mit Bayer 205 gemischtes Antigen gut sensibilisierte, daß das Mittel andererseits, 1 Stunde vor der Reinjektion subcutan injiziert, den Schock verhütete. Er erklärt diese Schutzwirkung mit einer durch die Anwesenheit dieses Mittels herbeigeführten Zustandsänderung der Blutflüssigkeit oder der Endothelzellen.

Schließlich haben noch *Schittenhelm* und *Ehrhardt* versucht, den anaphylaktischen Schock bei Hunden, Kaninchen und Meerschweinchen zu blockieren. Die Versuche an gegen Pferdeserum sensibilisierten Meerschweinchen mit Blockade allein ohne Milzextirpation waren erfolgreich, wenn Verff. die Tusche mehrtägig *intraperitoneal* injizierten; bei Reinjektion 24—36 Stunden nach der letzten Speicherung wurden von 6 Tieren 3 vor dem Schock bewahrt; die 3 gestorbenen hatten typisches Emphysem. Bei intravenöser Anwendung der Tusche 3 Tage je 2 ccm 1 : 10 (nicht ganz die von uns in einer Injektion gegebene Menge, aber doch größer als die von *Moldovan* benutzte) konnten *Schittenhelm* und *Ehrhardt* bei Reinjektion 36 Stunden nach der letzten Speicherung den Schock nicht verhüten; es handelt sich allerdings um einen Versuch mit nur 2 Tieren, aber beide starben und zeigten Emphysem bei fast schwarzer Lunge.

Wir gehen nun über zu der Besprechung eigener Versuche über die Wirkung der Blockade (in einigen Fällen in Kombination mit Milzexstirpation) bei bereits sensibilisierten Tieren.

a) *Versuche an Mäusen.*

Versuch 5. 10 Mäuse, dazu Kontrollen, wurden in der bereits mitgeteilten Weise (Versuche 1 und 2) sensibilisiert; am 11. Tag nach der zweiten Sensibilisierung wurden die 10 Tiere mit 0,3 ccm 20proz. Eisenzucker iv. blockiert und 24 Stunden später zugleich mit den Kontrollen geprüft durch Injektion von 0,4 ccm iv. Pferdeserum (nach *Ritz* im Volumen von 0,5 ccm mit NaCl injiziert).

Erfolg: Alle 10 mit Eisenzucker blockierten Mäuse starben (durchschnittlich in 80 Min.); 4 Kontrollen starben (durchschnittlich in 40 Min.).

Sektionsbefund: Milz, Leber und Darm makroskopisch gespeichert; Lungen nur bei 2 Tieren keine, bei den übrigen 8 Tieren mehr oder weniger deutliche Speicherung von Eisenzucker. Lungen bei allen Tieren hyperämisch; Emphysem nicht erkennbar.

Versuch 6. 14 Mäuse, dazu Kontrollen wurden ebenso wie bisher sensibilisiert; am 11. Tag nach der zweiten Sensibilisierung wurden 9 Tiere mit 0,2 ccm iv. Tusche (Verd. 1 : 3) blockiert, 5 Tiere mit Lithioncarmin 0,2 ccm (2,5%) iv. und 24 Stunden später wurden sie zugleich mit Kontrollen geprüft mit 0,5 ccm iv. Pferdeserum.

Erfolg: Mit Tusche blockierte Tiere 9 : 9; mit Lithioncarmin blockierte Tiere 5 : 3 (2 tot 15 und 20 Min.); 3 Kontrollen 3 : 0 (durchschnittlich tot in 24 Min.).

Sektionsbefund: Die mit Lithioncarmin blockierten 2 gestorbenen und die 3 überlebenden Tiere hatten sämtlich Lithioncarmin in Lunge, Milz und Leber gespeichert. Bei den 9 mit Tusche blockierten und überlebenden Tieren fand sich durchweg gute Speicherung der Organe außer der Nieren, wogegen die Lungen bei 5 Tieren gut, bei 4 Tieren aber nur schwach Tusche gespeichert hatten. Lungen bei allen gestorbenen Tieren hyperämisch. Emphysem nicht erkennbar.

Hiernach hat auch die nachträgliche Blockade mit Eisenzucker bei Mäusen keinen Einfluß gehabt, wohl aber die mit Lithioncarmin in 3 von 5 Fällen und mit Tusche sogar in sämtlichen untersuchten 9 Fällen.

b) Versuche an Meerschweinchen.

Versuch 7 (Dr. *Killian*). 11 Meerschweinchen, dazu Kontrollen wurden mit 0,01 ccm Pferdeserum subcutan sensibilisiert, davon wurden 2 Tiere am 20. Tag entmilzt und erhielten 24 Stunden später zusammen mit 8 Tieren 4 ccm 5 proz. Eisenzucker iv., 1 Tier erhielt 2,7 ccm 50 proz. Eisenzucker (anderes Eisenzuckerpräparat) iv.; nach weiteren 24 Stunden wurden die 11 Tiere zusammen mit 3 Kontrollen geprüft mit 0,4 ccm iv. Pferdeserum (als Dosis letalis minima austitriert). Blockade und Reinjektion erfolgten in der Mehrzahl der Fälle durch Injektion in die Jugularis.

Erfolg: Entmilzte und blockierte Tiere 2 : 0 (tot in 3 Min.); blockierte Tiere 7 : 0 (durchschnittlich tot in 5 Min.). Das mit 50 proz. Eisenzucker blockierte Tier starb ebenfalls in $2^1/_2$ Min.; Kontrollen 3 : 0 (durchschnittlich tot in 4 Min.).

Sektionsbefund: Meist schwache oder keine makroskopisch sichtbare Speicherung der Lunge, gelegentlich auch keine Speicherung der Milz, dagegen Leber und Darm gut gespeichert. Nur das mit 50 proz. Eisenzucker blockierte Tier enthielt starke Speicherung der Lunge. In allen Fällen Emphysem.

Versuch 8. 8 Meerschweinchen wurden zusammen mit Kontrollen mit 0,01 ccm Pferdeserum subcutan sensibilisiert; 7 von ihnen erhalten am 20. Tag 1 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) intravenös in die Jugularis, das 8. Tier erhält die gleiche Menge Tusche iv., aber erst am 21. Tag, und zwar 1 Stunde vor der Reinjektion; die Reinjektion am 21. Tag geschieht bei allen Tieren mit 0,03 ccm Pferdeserum iv. (als Dosis letalis minima austitriert; 0,02 wurde von 2 Kontrolltieren symptomlos ertragen). Ein blockiertes Tier erhält bei der Reinjektion 0,04 ccm Serum iv. Die Reinjektion erfolgte stets in die Jugularis, die Blockade desgleichen in 6 Fällen und in die Vene einer Extremität in 2 Fällen.

Erfolg: 4 jugular blockierte Tiere mit der Reinjektionsdosis 0,03 ccm überleben; 1 jugular blockiertes Tier mit der Reinjektionsdosis 0,04 ccm stirbt in 4 Min.; 1 jugular blockiertes Tier, bereits 1 Stunde nach Blockade geprüft mit 0,03 ccm, stirbt in $2^1/_2$ Min. Von 2 peripher blockierten Tieren stirbt 1 in 5 Min.; 1 Tier überlebt. Kontrollen 0,03 ccm Serum iv. 3 : 0 (durchschnittlich tot in 3 Min.); Kontrollen 0,02 ccm Serum iv. 2 : 2. Bei 3 Tieren von den 5 blockierten überlebenden wurden leichte anaphylaktische Symptome beobachtet, bei 2 Tieren keinerlei Symptome.

Sektionsbefund: Bei allen gestorbenen Tieren Lungenemphysem, mehr oder weniger starke Speicherung von Lunge, Milz und Leber. Bei allen überlebenden Tieren fehlendes Emphysem, aber Speicherung in Lunge, Milz und Leber.

Auch bei Meerschweinchen war also die nachträgliche Blockade mit Eisenzucker ohne Einfluß auf die aktive Anaphylaxie, wohl aber blieben tödlicher Schock und Emphysem aus bei Verwendung von Tusche.

Es gelang uns demnach in Versuch 8, die Ergebnisse von *Moldovan* und *Zolog* — bei Verwendung der doppelten Tuschedosis dieser Autoren — insoweit zu bestätigen, als wir durch Blockade 24 Stunden vor der Reinjektion in den meisten Fällen (5 von 6) gegen die einfache Dosis letalis minima 0,03 ccm die Meerschweinchen vor dem anaphylaktischen Schock schützen konnten; dagegen blieb das mit 0,04 ccm Serum geprüfte Tier nicht am Leben; also eine immerhin viel schwächere Blockadewirkung als bei *Moldovan*, dem es gelang, gegen die 2—4fache tödliche Minimaldosis Schutz zu erzielen.

In Versuch 8 starb uns ein Tier im Schock bei Prüfung 1 Stunde nach Tuscheblockade. Wenn dieses Tier in den Organen bei makroskopischer Betrachtung ebenso reichlich Tusche gestapelt zu haben schien wie die überlebenden Tiere in Versuch 8, so zeigte sich bei mikroskopischer Untersuchung, daß hier 1 Stunde nach Blockade der größere Teil der Tusche in der Lunge noch extracellulär bzw. in den Gefäßen abgelagert war, während bei den anderen überlebenden Tieren, die erst 24 Stunden nach der Blockade reinjiziert und nach weiteren 6 Stunden getötet und seziert wurden, eine ausgedehnte Aufnahme von Tusche in den Zellen sich vorfand, und zwar in den Histiocyten des peribronchialen und perivasculären Gewebes, ein Befund, wie ihn *Aschoff* bereits als wesentlich bei der Speicherung von Tusche in der Lunge beschrieben hat. Die übrigen Organe dieses Tieres wurden histologisch nicht untersucht.

Schließlich haben wir noch einen Versuch angefügt, in welchem statt wie bisher mit 1,0 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) — bei welcher Dosis wir infolge Toxizität etwa 30% der Meerschweinchen allein durch Blockade verloren — in Anlehnung an *Moldavan* und *Zolog* mit 0,5 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) iv. blockiert wurde; hierbei starb kein Tier durch Tusche, wohl aber 2 Kontrolltiere, die 0,8 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) iv. erhielten († 2—3 Stunden). Auch benutzten wir zur Sensibilisierung die gleiche Dosis wie *Moldovan* und *Zolog*, 0,1 ccm Pferdeserum subcutan.

Versuch 9. Von 15 dieser Art sensibilisierten Meerschweinchen wurden 10 Tiere 20 Tage später blockiert (7 Tiere durch die Jugularis, 3 Tiere durch die Vene einer hinteren Extremität); am nächsten (21.) Tag wurde an den übrigen 5 nichtblockierten Tieren die Dosis letalis minima bestimmt als 0,25 ccm i. v. bei 2 Tieren. (Ein mit 0,2 reinjiziertes Kontrolltier verharrte 5 Min. schwerkrank in Seitenlage, aber überlebte.) Anschließend gelangten die blockierten Tiere zur Reinjektion (also 24 Stunden nach der Blockade). (Dosis letalis minima bei *Moldovan* 0,002.)

Erfolg: Jugular blockierte Tiere 7 : 0 (durchschnittlich tot 2,7 Min.); peripher blockierte Tiere 3 : 2 (1 Tier tot 3 Min.); Kontrollen 2 : 0 (durchschnittlich tot $3^1/_2$ Min.).

Sektionsbefund: Bei allen gestorbenen Tieren Lungenemphysem; bei den 2 überlebenden kein Emphysem. Speicherung von Tusche in Lunge, Milz und Leber meist gut ausgeprägt.

Der Versuch zeigt, daß die Wirkung der Blockade hier sehr viel schwächer ausfällt als in unseren vorhergehenden Versuchen, was wohl zurückzuführen ist auf die geringere Tuschedosis, möglicherweise aber außerdem auf die hohe Sensibilisierungsdosis (trotz derer die Tiere nur schwach sensibilisiert waren) einerseits und die hohe Reinjektionsdosis andererseits.

3. Versuche, die passive Anaphylaxie durch eine der Sensibilisierung vorausgehende Blockade zu verhüten.

Daß es uns gelungen ist, auch die passive Anaphylaxie an Meerschweinchen durch Blockade in einigen Fällen zu verhüten, ist bereits von *Neufeld* kurz mitgeteilt worden (*Neufeld* l. c.).

Inzwischen haben wir in weiteren Versuchen an Meerschweinchen und Mäusen das erste Ergebnis bestätigen können und teilen hierunter den damaligen und die nachfolgenden Versuche mit.

a) An Meerschweinchen.

Versuch 10 (Dr. *Killian*). 2 Meerschweinchen erhielten je 5 ccm 5proz. Eisenzucker intrajugular und am nächsten Tag zusammen mit 2 Kontrolltieren 1,0 ccm Kaninchen-Antipferdeserum subcutan, eine Dosis, die im Vorversuch gegen 0,5 ccm Pferdeserum iv. als Dosis letalis minima präpariert hatte. Nach weiteren 24 Stunden erhielten die beiden blockierten Tiere sowie die 2 Kontrolltiere 0,5 ccm Pferdeserum intrajugular.

Erfolg: Mit Eisenzucker blockierte Tiere 2 : 2 (beide Tiere überleben). Dabei zeigt 1 Tier geringe Unruhe während 3 Min. Kontrollen 2 : 0 (beide tot in 3 Min.).

Sektionsbefund: Emphysem der Lunge bei beiden Kontrollen. Kein Emphysem bei den blockierten Tieren. Speicherung in allen Organen nur gering.

Versuch 11. Ein Meerschweinchen wurde mit 1,0 ccm Tusche (Verd. 1 : 2), ein zweites mit 3,0 ccm 50proz. Eisenzucker durch die Vene einer vorderen Extremität blockiert; am folgenden Tag erhielten beide Tiere zusammen mit 4 normalen Kontrolltieren je 0,2 ccm Kaninchen-Antipferdeserum Nr. 947 (Carbolzusatz) intravenös (Extremitätenvene) und wurden nach weiteren 24 Stunden reinjiziert (Jugularis), nachdem zuvor an den Kontrolltieren als Dosis letalis minima 1,1 ccm Pferdeserum iv. bei 2 Tieren festgestellt worden war.

Erfolg: Das mit Tusche blockierte Tier überlebt die Reinjektion; das mit Eisenzucker blockierte Tier überlebt die Reinjektion (letzteres zeigt leichte Schocksymptome und verharrt 6 Min. in Seitenlage).

Sektionsbefund: Emphysem der Lunge bei den Kontrolltieren. Kein Emphysem bei den beiden blockierten Tieren und Speicherung von Eisenzucker bzw. Tusche in Lunge, Milz und Leber.

Versuch 12. 3 Meerschweinchen wurden mit 0,5 ccm Tusche (Verd. 1 : 2), 4 Meerschweinchen mit 1,3 ccm 50proz. Eisenzucker durch die Jugularis blockiert; am nächsten Tage erhielten sie zusammen mit 6 Kontrolltieren je 0,4 ccm Kaninchen-Antipferdeserum Nr. 947 (Carbolzusatz) ip. und wurden 24 Stunden später mit Pferdeserum in eine Vene der vorderen Extremitäten reinjiziert, nachdem unmittelbar zuvor an den Kontrolltieren die Dosis minima letalis als 0,4 ccm Pferdeserum bei 2 Tieren ermittelt worden war.

Erfolg: Mit Tusche blockierte Tiere 3 : 2 (1 Tier tot in 5 Min.). (Von den 2 überlebenden Tieren zeigte das eine schwere anaphylaktische Symptome, das andere kaum irgendwelche Symptome.) Mit Eisenzucker blockierte Tiere 4 : 1 (durchschnittlich tot 4 Min). (Das überlebende Tier zeigt keine Symptome.) Kontrollen 2 : 0 (durchschnittlich tot in 4 Min.).

Sektionsbefund: Emphysem der Lunge vorhanden bei den gestorbenen Tieren, bei den überlebenden kein Emphysem. Speicherung mäßig sowohl bei Eisenzucker als auch bei Tusche.

Auch die passive Anaphylaxie an Meerschweinchen läßt sich demnach durch Blockade mit Tusche (in 3 unter 4 Fällen) verhüten, außerdem aber auch durch Blockade mit Eisenzucker (in 4 unter 7 Fällen) letzteres also im Gegensatz zur aktiven Anaphylaxie, die wir durch Eisenzucker nicht beeinflussen konnten.

b) An Mäusen.

Die passive Anaphylaxie bei der Maus wird in einer nachfolgenden Arbeit gesondert besprochen.

Versuch 13. 8 Mäuse wurden mit je 0,1 ccm Tusche (Verd. 1 : 3), 5 Mäuse mit je 0,3 ccm 30 proz. Eisenzuckerlösung intravenös behandelt. Am folgenden Tage erhielten sie zusammen mit 5 Kontrollmäusen je 0,4 ccm Kaninchen-Antipferdeserum Nr. 947 intraperitoneal. Nach weiteren 48 Stunden wurden sämtliche Tiere auf passive Anaphylaxie geprüft mit der bei den Kontrolltieren zuvor austitrierten Dosis minimalis letalis 1,0 ccm Pferdeserum iv.

Erfolg: Mit Tusche blockierte Tiere 8 : 5 (durchschnittlich tot 57 Min.); die 5 überlebenden Tiere zeigten vorübergehend geringe Krankheitssymptome. Mit Eisenzucker blockierte Tiere 5 : 4 (tot 50 Min.); die 4 überlebenden Tiere zeigten vorübergehend sehr geringe Krankheitssymptome. Kontrollen: 3 : 0 (durchschnittlich tot in 35 Min.). (1 Kontrolltier, mit 1,2 ccm reinjiziert, tot in 26 Min.; 1 Kontrolltier, mit 0,9 ccm reinjiziert, überlebt.)

Sektionsbefund: Die 3 mit Tusche blockierten und gestorbenen Tiere zeigten schwache Speicherung der Lunge, starke Speicherung in Milz und Leber. Bei den 5 überlebenden, mit Tusche blockierten Tieren hatten nur in einem Falle Lunge, Milz und Leber stark gespeichert; in 4 Fällen hatten nur Leber und Milz stark gespeichert, und die Lungen — außer einem Fall schwacher Speicherung — waren frei von makroskopisch wahrnehmbarer Tuschespeicherung.

Das eine mit Eisenzucker blockierte und gestorbene Tier hatte in Lunge und Leber stark Eisenzucker, in Milz nur geringfügig gespeichert. Von den 4 überlebenden mit Eisenzucker blockierten Mäusen hatten bei 2 Tieren Lungen und Leber stark gespeichert, bei den übrigen 2 Tieren hatten die Lungen nur schwach, die Leber aber stark gespeichert; die Milz hatte bei diesen Tieren ebenso wie bei dem gestorbenen Tier durchweg nur schwach Eisenzucker gespeichert.

Die Lungen der im Schock gestorbenen Tiere waren hyperämisch gerötet. Emphysem und Lungenstarre waren nur bei einem Kontrolltier zu beobachten.

Also auch bei Mäusen läßt sich die passive Anaphylaxie blockieren, und zwar mit Tusche in 5 unter 8 Fällen und mit Eisenzucker sogar in 4 unter 5 Fällen, letzteres im Gegensatz zu den negativen Ergebnissen bei Versuchen an aktiv anaphylaktischen Mäusen.

4. Versuche, bei schon sensibilisierten Tieren durch nachträgliche Blockade die Auslösung anaphylaktischer Reaktionen am isolierten überlebenden Organ zu verhindern.

Zuletzt seien Versuche mitgeteilt, die entscheiden sollten, ob bei sensibilisierten Meerschweinchen und Mäusen durch Blockade auch die bekannten anaphylaktischen Reaktionen überlebender Organe sich beeinflussen lassen. Wir haben hierzu als Versuchsobjekt den überlebenden Uterus gewählt. Daß die vitalgespeicherten Kolloide in vivo auch vom Uterus aufgenommen werden (in der Gravidität in erhöhtem Maße), ist seit *Goldmann* bekannt. Neuerdings hat *Testa* Untersuchungen mit Vitalfärbung bei Meerschweinchen angestellt über die Verteilung von Trypanblau und Carmin im Uterus; hiernach speichern am ruhenden Uterus (d. h. außerhalb der Gravidität) nur die Zellen des Bindegewebes.

Zu unseren Versuchen am überlebenden Uterus benutzten wir die verbesserte Neukirchsche Kammer, wie sie zurzeit im Pharmakologischen Institut Berlin in Gebrauch ist. Die Kontraktionen wurden bei einem Teil der geprüften Uteri auf die berußte Trommel eines Kymographions geschrieben, teils nach dem Ausschlag des Schreibhebels allein bewertet. Als Nährflüssigkeit verwendeten wir auf 39° C konstant erwärmte Tyrodelösung mit Sauerstoff durchperlt. Die Versuchstechnik wurde uns in entgegenkommender Weise von Herrn Prof. *Joachimoglu* und Herrn Dr. *Hinzelmann* demonstriert. Wir haben stets Meerschweinchen im Gewicht von etwa 200 g verwendet, weil hier der Uterus noch klein ist und im allgemeinen keine übermäßig großen Tonusschwankungen aufweist, wie schon *Dale* beobachtet hat; aus dem gleichen Grunde durften wir keine graviden Tiere verwenden und haben die Tiere, als sie erst 140—160 g wogen, bereits 14 Tage vor dem Versuch von den männlichen Tieren isoliert. Wir haben stets, nach Entnahme des Uterus einschließlich des proximalen Teils der Scheide, durch Scherenschnitt von der Scheide her Uterus und Hörner geteilt; in nachfolgender Beschreibung bedeutet Horn I das zuerst geprüfte, Horn II das bis

zur Prüfung in einem mit Sauerstoff durchperlten Reservegefäß — ebenfalls bei 39° C — aufbewahrte Horn.

Nach Befestigung des Uterushornes an dem Schreibhebel haben wir stets — mindestens aber 5 Min. — mit dem Beginn des Versuches gewartet, bis das Horn nach einigen Tonusschwankungen bzw. Bewegungslosigkeit regelmäßige Kontraktionen auszuführen begann.

In allen Fällen, wo wir durch Serumzusatz keine Kontraktion erzielten, haben wir anschließend Flüssigkeitswechsel der Tyrodelösung vorgenommen bzw. Tenosin oder Chinin in alkoholischer Lösung zugesetzt, um uns über die Reaktionsfähigkeit des Organs zu vergewissern. Gelegentlich wurde in der gleichen Absicht ein 2. Mal Serum zugesetzt, aber in hoher Konzentration, wie sie bereits auf den normalen Uterus kontraktionserregend wirkt; dabei haben wir in jedem Falle ausnahmslos noch Kontraktionen erzielt, so daß wir sagen können, daß bei dem von uns untersuchten Material ausschließlich an sich reaktionsfähige Uterushörner zur Verfügung standen.

a) Versuche am Meerschweinchenuterus.

Versuch 14 (Tab. A u. B). 22 Meerschweinchen wurden mit 0,01 ccm frischem, nichtinaktiviertem Pferdeserum subcutan sensibilisiert, am

Tabelle A (Versuch 14).

Die Meerschweinchen wurden 12 Tage nach der Sensibilisierung zwecks Entnahme des Uterus getötet; die blockierten Tiere erhielten 24 Std. vor Tötung 0,8 ccm Tusche (Verdünnung 1 : 2) intrajugular.

+ bedeutet mittelstarke Kontraktion, ++ starke Kontraktion, — keine Kontraktion, ± schwache Kontraktion.

Tier Nr.	Sensibilisierung	Blockade	Reaktionen der Uterushörner und Serumverdünnungen
1	0,01 ccm Pferdeserum sc.	blockiert (Uterus grau gespeichert)	Horn I 1 : 800 — „ II 1 : 400 —
2	desgl.	desgl.	„ I 1 : 400 — „ II 1 : 400 —
3	„	„	„ I 1 : 400 ++ „ II weg. starker Tonusschwank. Prüfung unmögl.
4	„	nicht blockiert	Horn I 1 : 2000 ++ „ II 1 : 4000 ++
5	„	nicht blockiert	„ I 1 : 4000 ++ „ II 1 : 8000 —
6	nicht sensibilisierte Kontrollen	nicht blockiert	„ I 1 : 4000 — „ II nicht geprüft
7	nicht sensibilisierte Kontrollen	nicht blockiert	„ I 1 : 2000 — „ II 1 : 400 —
8	nicht sensibilisierte Kontrollen	nicht blockiert	„ I 1 : 20 — „ II nicht geprüft
9	nicht sensibilisierte Kontrollen	nicht blockiert	„ I 1 : 5 + „ II 1 : 2 ++
10	nicht sensibilisierte Kontrollen	nicht blockiert	„ I 1 : 10 — „ II 1 : 10 ±

Tabelle B (Versuch 14).

Die Meerschweinchen wurden sensibilisiert und intrajugular blockiert (am 12. Tag) wie im vorigen Versuch; am 13. Tag nach der Sensibilisierung Uterusextirpation am lebenden Tier, Prüfung des Uterus im Schultz-Dale-Versuch und Reinjektion der Tiere $^1/_2$—1 Std. nach der Operation mit 0,3 ccm Pferdeserum intrajugular.

Tier Nr.	Sensibilisierung	Blockade	Reinjektion	Reaktionen der Uterushörner und Serumverdünnungen	Bemerkungen
1	0,01 ccm Pferdeser. sc.	blockiert	† 3 Min. Emphysem der Lunge	Horn I 1:800 – „ II 1:800 + +	Lunge minimal gespeichert Horn II desgl. Horn I grau gespeichert
2	desgl.	„	überlebt, kein Emphysem, leichteSchocksymptome	„ I 1:800 – „ II 1:200 –	Lunge gut (schwarz) gespeichert, Uterus grau gespeichert
3	„	nicht blockiert	† 5 Min. Emph.	„ I 1:8000 + +	
4	„	nicht blockiert	† 4 „ „	„ I 1:4000 + + „ II 1:2000 + +	
5	„	nicht blockiert	† 3 „ „	„ I 1:8000 – „ II 1:4000 + +	
6	nicht sensibilisierte Kontrollen	nicht blockiert	·	„ I 1:80 – „ II 1:40 –	
7	nicht sensibilisierte Kontrollen	blockiert	·	„ I 1:5 + + „ II 1:10 –	Lunge u. Uterus wie bei Tier 2
8	nicht sensibilisierte Kontrollen	„	·	„ I 1:10 – „ II 1:20 –	Lunge u. Uterus wie bei Tier 2
9	0,01 ccm Pferdeser. sc.	nicht blockiert	† 3 Min. Emph.	·	
10	„	nicht blockiert	† 4 „ „	·	
11	„	nicht blockiert	† $3^1/_2$ „ „	·	
12	„	nicht blockiert	† 6 „ „	·	
13	„	nicht blockiert	0,2 ccm Pferdeserum überlebt	·	
14	„	nicht blockiert	desgl.	·	

11. Tag nach der Sensibilisierung und ebenso am 12. Tag erhielten davon je 4 Tiere 0,8 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) intrajugular. Von den 4 am 11. Tag blockierten (1 Tier starb nach der Tusche innerhalb 24 Stunden) wurden bei 3 Tieren am nächsten (12.) Tag und ebenso bei 2 sensibilisierten, aber nichtblockierten Tieren nach Tötung die Hörner des Uterus auf Überempfindlichkeit geprüft.

Von den 4 am 12. Tag blockierten Tieren (2 Tiere starben nach der Tusche innerhalb 24 Stunden) wurde bei 2 Tieren am nächsten (13.)

Tag und desgleichen bei 3 sensibilisierten, aber nichtblockierten Tieren der Uterus durch Operation entfernt, die Hörner auf Überempfindlichkeit geprüft und desgleichen die Tiere selbst durch intrajugulare Injektion von Pferdeserum etwa $^1/_2$—1 Stunde (je nach Befinden) nach der Operation.

Zur Kontrolle wurde gleichzeitig am selben Tage stets die Wirkung verschiedener Serumverdünnungen auf die Uterushörner normaler, nichtsensibilisierter Meerschweinchen studiert; als weitere Kontrolle wurden in Versuch 14 B die Uterushörner von 2 nichtsensibilisierten, aber 24 Stunden zuvor mit 0,8 ccm Tusche (Verd. 1 : 2) intrajugular gespeicherten Meerschweinchen geprüft. Außerdem wurde am 12. Tag für die Reinjektion von Serum die Dosis letalis minima an 9 Tieren austitriert (0,3 ccm i. v., 4 Tiere tot 3—6 Min.).

Versuch 15 (Tab. C). Gleiche Versuchsanordnung wie in Versuch 14, Tab. B, nur daß die Tiere und ihr Uterus erst am 21. Tag nach Sen-

Tabelle C (Versuch 15).

Die Meerschweinchen wurden sensibilisiert wie im vorigen Versuch und 20 Tage später intrajugular blockiert mit 1 ccm Tusche (Verd. 1 : 2); am 21. Tag nach der Sensibilisierung Uterusextirpation am lebenden Tier, Prüfung des überlebenden Uterus und Reinjektion der Tiere 1 Std. nach Operation mit 0,1 ccm Pferdeserum intrajugular.

Tier Nr.	Sensibilisierung	Blockade	Reinjektion	Reaktionen der Uterushörner und Serumverdünnungen	Bemerkungen
1	0,01 ccm Pferdeser. sc.	blockiert	überlebt (kein Emphysem)	Horn I 1:8000 – „ II 1:800 –	Lunge schwarzgrau gut gespeichert; Uterus grau gespeichert
2	desgl.	„	desgl.	„ I 1:800 – „ II 1:200 +	desgl.
3	„	nicht blokkiert	† 4 Min. Emph.	„ I 1:8000 ++	
4	„		† 5 „ „	„ I 1:3200 – „ II 1:8000 ++	
5	„		† $3^1/_2$ „ „	„ I 1:16 000 –	
6	„		† 4 „ „	„ I 1:8000 + „ II 1:16 000 –	
7	Nicht sensibilisierte Kontrollen		·	„ I 1:40 – „ II 1:5 +	
8			·	„ I 1:10 – „ II 1:5 ++	
9	0,01 ccm Pferdeser. sc.		† 4 Min. Emph.	·	
10	desgl.		† 5 „ „	·	
11	0,005 ccm Pferdeser. sc.		lebt	·	

sibilisierung geprüft wurden. Im ganzen wurden 12 Tiere sensibilisiert, 4 davon wurden 20 Tage später intrajugular blockiert mit Tusche diesmal 1 ccm (Verd. 1 : 2), 2 starben innerhalb 24 Stunden nach Tusche, so daß am folgenden Tag nur 2 blockierte und 4 nichtblockierte Tiere bzw. ihr Uterus auf Überempfindlichkeit geprüft wurden. Zur Feststellung der Dosis letalis minima 0,1 ccm iv. mußten wir uns mit 4 Tieren begnügen. Im übrigen wurden wie im vorigen Versuch gleichzeitig Uterushörner von Normaltieren geprüft.

Sowohl aus Versuch 14 (Tab. A u. B) als aus Versuch 15 (Tab. C) geht hervor, daß die Blockade mit Tusche am aktiv sensibilisierten Meerschweinchen die Auslösung der anaphylaktischen Reaktion auch am überlebenden Organ zu hemmen vermag; durchschnittlich sind bei sensibilisierten, blockierten Tieren zehnfache und noch größere Mengen Serum als bei nichtblockierten nötig, um eine Kontraktion des überlebenden Uterus auszulösen.

Als gelegentliche Ausnahmen unwirksamer Blockade sind zu erwähnen in Tab. A Tier Nr. 3, Horn I, das menstruell geschwollen war, und in Tab. B Tier Nr. 1, das anscheinend ungenügend blockiert war, derart, daß es selbst im anaphylaktischen Schock starb, und daß zugleich das eine Horn seines Uterus im Vergleich mit den Uterushörnern sensibilisierter nichtblockierter Tiere volle Sensibilität aufwies, also anscheinend eine Parallelität zwischen dem Sensibilitätsgrad von Gesamtorganismus und dem des isolierten Organes. Ferner waren in allen Fällen erfolgreicher Blockade sowohl Lunge wie Uterus bei makroskopischer Betrachtung gut gespeichert. In dem einen Falle, Tier Nr. 1 Tab. B, wo die Lunge schwach gespeichert hat, starb das Tier im anaphylaktischen Schock; die beiden Uterushörner reagierten verschieden entsprechend ihrem Speicherungsgrad.

b) Versuche am Mäuseuterus.

Versuch 16 (Tab. D). Die Versuchstechnik war die gleiche, wie die in den Versuchen am Meerschweinchenuterus angewandte. Die Mäuse hatten ein Gewicht von ungefähr 17 g. Es gelangten gleichzeitig zur Prüfung mit ein und demselben Serum Uteri von normalen, von mit Pferdeserum sensibilisierten und von sensibilisierten und 24 Stunden vor der Uterusprüfung iv. blockierten Mäusen und schließlich von normalen 24 Stunden vor der Uterusprüfung iv. blockierten Tieren. Ein Teil der Tiere wurden mit 0,3 ccm ip. und nach 3 Tagen mit 0,5 ccm Pferdeserum ip. sensibilisiert, und nach weiteren 12 Tagen wurden die überlebenden Uteri geprüft; eine weitere Anzahl genau so behandelter Tiere wurde 24 Stunden vor der Uterusprüfung iv. blockiert mit Tusche 0,2 ccm (Verd. 1 : 3) bzw. mit Trypanblau 0,2 ccm 1%. Auch in diesen Versuchen wurden, falls die Uterushörner auf Zusatz von Serumver-

dünnungen nicht reagierten, höhere Serumkonzentrationen bzw. Chinin 0,5 g in alkoholischer Lösung zugefügt oder Flüssigkeitswechsel vorgenommen, um uns über die Reaktionsfähigkeit des Organes zu vergewissern; sämtliche von uns verwendeten Hörner der Mäuseuteri erwiesen sich dabei als reaktionsfähig, d. h. sie kontrahierten sich. Es sei vorweggenommen, daß wie bei den Meerschweinchen, auch die überlebenden Uteri normaler Mäuse nur auf hohe Serumkonzentrationen bis zur Verdünnung 1 : 5 reagierten; mit Serum in Verdünnungen unter 1 : 5 vermochten wir am normalen Uterus keine Kontraktion zu erzielen. Dagegen konnten wir am Uterus sensibilisierter Mäuse bei Verwendung von Serum bis zur Verdünnung 1 : 800 und einmal sogar bis 1 : 1600 starke Kontraktionen beobachten. Geschwollene bzw. gravide Uterushörner wurden wegen großer Tonusschwankungen nicht geprüft.

Tabelle D (Versuch 16).

Die Mäuse wurden 12 Tage nach der Sensibilisierung zwecks Entnahme des Uterus getötet; die blockierten Tiere erhielten 24 Std. vor Tötung 0,2 ccm Tusche (Verd. 1 : 3) bzw. 0,2 ccm 1 proz. Trypanblau intravenös.

Tier Nr.	Sensibilisierung	Blockade	Reaktionen der Uterushörner und Serumverdünnungen
1	0,3 + 0,5 Pferdeserum i. p.	Tusche	Horn I 1 : 100 +
2	"	"	" I 1 : 400 –
3	"	"	" I 1 : 400 +
4	"	"	" I 1 : 1600 –
5	"	"	" I 1 : 800 –
6	"	"	" I 1 : 800 +
7	"	Trypanblau	" I 1 : 200 +
8	"	"	" I 1 : 400 + +
9	"	"	" I 1 : 800 –
10	"		" I 1 : 400 + +
			" II 1 : 800 + +
11	"		" I 1 : 800 + +
12	"		" I 1 : 800 –
13	"		" I 1 : 1600 +
14	"		" I 1 : 1600 –
15			" I 1 : 3 +
16			" I 1 : 3 –
17		nicht blockiert	" I 1 : 10 –
			" II 1 : 3 +
18			" I 1 : 5 +
19	nicht sensibilisierte Kontrollen		" I 1 : 10 –
20			" I 1 : 100 –
21			" I 1 : 400 –
22			" I 1 : 3 +
23			" I 1 : 10 –
24			" I 1 : 10 –

Somit läßt sich die anaphylaktische ***Reaktion auch am überlebenden*** *Mäuseuterus beobachten und ebenso die* ***Hemmung durch nachträgliche***

Blockade mit Tusche und Trypanblau an zuvor sensibilisierten Mäusen; durchschnittlich ist bei sensibilisierten, blockierten Mäusen die zweifache Menge Serum als bei nichtblockierten nötig, um eine Kontraktion des überlebenden Uterus zu erzielen.

Wenn hierbei Unregelmäßigkeiten auftreten wie bei der blockierten Maus 6 (Kontraktion 1 : 800) und andererseits bei der nichtblockierten Maus 12 (keine Kontraktion 1 : 800), so steht demgegenüber die Beobachtung, daß die Uteri der nichtblockierten Mäuse durchweg starke und längerwährende Kontraktionen aufweisen als die der blockierten Tiere. Bei diesen Versuchen am Mäuseuterus war ein Parallelismus zwischen positiver Speicherung des Uterus und Verhütung der anaphylaktischen Reaktion des Uterus nicht festzustellen. Vielmehr schien auch unabhängig von der lokalen Speicherung des Uterus die anaphylaktische Reaktion gehemmt zu sein.

Ergebnisse.

Überblicken wir die Gesamtheit unserer Versuche, so ergibt sich zwar insofern ein analoges Verhalten mit dem Ausfall der früher mitgeteilten Versuche an Mäusen, die vor oder nach der Einverleibung von Pneumokokkenantigen blockiert wurden, als auch die Anaphylaxie ebenso wie die Immunität durch Tuscheinjektion sowohl vor als auch nach der Sensibilisierung durchbrochen wurde. Nun bestehen aber einige bedeutende Abweichungen. Einmal waren bei aktiver Anaphylaxie alle Versuche mit Eisenzucker — mit dem sich in *Bielings* und unseren Versuchen die Entstehung von Agglutininen, Hämolysinen und Schutzstoffen verhindern ließ — erfolglos; nur mit Tusche hatten wir Erfolg, bei Mäusen auch mit Lithioncarmin und Trypanblau (an Meerschweinchen haben wir letztere Stoffe nicht versucht). Ferner erwies sich die Blockade der Immunität wirksamer, wenn sie vor der Immunisierung, dagegen die Blockade der Anaphylaxie, wenn sie nach der Sensibilisierung vorgenommen wurde — wenigstens bei der Tuscheblockade. Hier wurden alle 9 nach Eintritt der Sensibilität blockierten Mäuse gerettet, während Tusche, vor der Sensibilisierung angewandt, nur 2 von 4 Tieren rettete. Auch bei Meerschweinchen war der Erfolg der Tuscheblockade nach vorausgehender Sensibilisierung bedeutend besser als umgekehrt. Bei Verwendung von Lithioncarmin, das wir nur bei Mäusen versuchten, war allerdings der Erfolg der Blockade vor der Sensibilisierung eher etwas besser.

Die Milzexstirpation war im Gegensatz zu *Bielings* und unseren Versuchen über Immunkörperbildung ohne deutlichen Einfluß auf das Entstehen der Anaphylaxie.

Alle diese Beobachtungen zeigen, daß hier die Verhältnisse wesentlich anders liegen; wahrscheinlich wirkt die Blockade nicht, wie bei den Versuchen über Pneumokokkenimmunität, in dem Sinne, daß sie die Entstehung des anaphylaktischen Antikörpers, sondern dadurch, daß sie das Zustandekommen des anaphylaktischen Schocks verhütet.

In einigen Versuchen an Meerschweinchen schien es, daß der Schock nur in den Fällen verhindert wurde, wenn die Lungen intensiv Tusche gespeichert hatten; dabei muß allerdings in Betracht gezogen werden, daß die starren und geblähten Lungen der im Schock gestorbenen Tiere infolge Größenzunahme heller und folglich schwächer gefärbt erschienen als die nichtemphysematösen normalgroßen tuschegeschwärzten Lungen der überlebenden Tiere. Wenn man diese letzteren künstlich aufblähte, erschienen sie immerhin noch stärker gespeichert (geschwärzt) als die emphysematösen Lungen der dem Schock erlegenen Tiere. Bei mikroskopischer Untersuchung fand sich bei den durch Tusche geschützten Tieren intracelluläre Speicherung der Tusche in peribronchialen perivasculären und perialveolären Histiocyten der Lunge. Ein aktiv sensibilisiertes Tier, das bereits 1 Stunde nach der Blockade reinjiziert wurde und im anaphylaktischen Schock starb, hatte zwar makroskopisch geschwärzte Lungen, aber bei mikroskopischer Betrachtung fanden wir, daß nur geringe intracelluläre Speicherung in der Lunge stattgefunden hatte, während die Gefäße der Lunge vollgestopft mit extracellulären Tuschepartikeln erschienen; die vitale Speicherung war also noch nicht weit vorgeschritten.

Immerhin sind diese Ergebnisse nicht so eindeutig, um sagen zu können, daß der Ausgang der Prüfung auf anaphylaktischen Schock bei Meerschweinchen ausschließlich von dem Speicherungsgrad der blockierten Lunge abhängig ist.

Dagegen scheint für den Meerschweinchenuterus zwischen Hemmung der anaphylaktischen Reaktion und positiver Speicherung von Tusche im Uterus eine kausale Relation zu bestehen.

Aus den Versuchen an Mäusen können wir nichts Näheres entnehmen über die Wirkungsweise der Blockade auf den Schock oder auf die Reaktion des isolierten Uterus; auch sind hier die Erfolgsorgane und die anaphylaktischen Reaktionen noch wenig erkannt.

Auffallend ist der Unterschied zwischen Tusche- und Eisenzuckerblockade. Gehen wir von der Annahme aus, daß die Blockade bei den Anaphylaxie- ebenso wie bei den Antikörper- und Immunkörper-Untersuchungen dadurch wirkt, daß die Zellen, die gespeichert haben, mehr oder weniger in bestimmten Funktionen gehemmt sind, so dürfen wir schließen, daß für die Entstehung von Agglutininen, Lysinen oder Tropinen nicht die Unversehrtheit der gleichen Zellen oder Zellbestandteile wesentlich ist wie für das Zustandekommen des anaphylaktischen Schocks.

Besonders auffallend ist auch, daß bei Meerschweinchen und Mäusen durch Eisenzuckerblockade die passive Anaphylaxie verhindert werden konnte, während dasselbe Kolloid bei aktiv anaphylaktischen Tieren in unseren Versuchen niemals wirksam war im Gegensatz zu den Ver-

suchen von *Petersen*, *Jaffe*, *Lewinson* und *Hughes* am Hunde mit mehrmaligen Injektionen von Eisenzucker.

Eine einheitliche Erklärung der Beobachtungen, wie wir sie bei den Versuchen über Pneumokokkenimmunität und Antikörperbildung zu geben versucht haben, scheint uns für die Anaphylaxie vorläufig noch nicht möglich.

Schlußsätze.

Bei aktiv gegen Pferdeserum sensibilisierten Meerschweinchen und Mäusen gelang es, durch intravenöse Injektion vitalgespeicherter Kolloide (Blockade) die Auslösung des anaphylaktischen Schocks in einem Teil der Fälle zu verhindern. Dies gelang sowohl, wenn das Kolloid vor der Sensibilisierung, als auch, wenn es nach eingetretener Sensibilität injiziert wurde; in letzterem Falle war die Wirkung regelmäßiger.

Hierbei hatten wir Erfolg bei Meerschweinchen mit Tusche, bei Mäusen mit Tusche, Trypanblau und Lithioncarmin (die beiden letzteren wurden bei Meerschweinchen nicht versucht), und zwar bei Prüfung mit der einfachen Dosis letalis minima von Pferdeserum; Eisenzucker dagegen war bei beiden Tierarten erfolglos, während dieses Kolloid nach früheren Versuchen geeignet ist, die Entstehung der Pneumokokkenimmunität zu verhindern.

Der gleichsinnige Ausfall der vorhergehenden und der nachträglichen Blockade spricht dafür, daß in beiden Fällen die Auslösung des Schocks gehemmt ist, während kein Anhaltspunkt gegeben ist für die Annahme, daß durch vorausgehende Blockade die Bildung des anaphylaktischen Reaktionskörpers verhindert wurde.

Ebenso wie die aktive wurde auch die passive Anaphylaxie bei Meerschweinchen und Mäusen durch Blockade (24 Stunden vor der Sensibilisierung) verhindert. Auch hier gelang uns keine vollständige Aufhebung der Überempfindlichkeit, sondern die Tiere waren nur gegen die einfache Dosis letalis von Antigen geschützt.

Hierbei erwies sich, im Gegensatz zu den Versuchen über aktive Anaphylaxie, auch die Blockade mit Eisenzucker wirksam.

Aus den Sektionsbefunden gewannen wir in einem Teil der Fälle den Eindruck, daß bei Meerschweinchen der Erfolg der Blockade von aktiver und passiver Anaphylaxie mittels Tusche von nachweislicher Speicherung peribronchialer, perivasculärer und perialveolärer Histiocyten der Lunge mittels Tuschepartikeln abhängt.

Auch die anaphylaktische Reaktion des überlebenden Uterus von mit Pferdeserum sensibilisierten und danach blockierten Meerschweinchen und Mäusen wird gehemmt; bei Meerschweinchen mußten 10fache und zum Teil noch größere Mengen, bei Mäusen die 2fache Menge Antigen zugesetzt werden als bei den Uteri sensibilisierter, aber nichtblockierter Tiere, um eine Kontraktion zu erzielen.

Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen ist eine Arbeit von *Jungeblut* und *Berlot* im Journ. of exp. med. **44,** Nr. 1, S. 129, 1926 erschienen. Die Verff. konnten in 2 Versuchen durch Tusche-Blockade vor der Sensibilisierung gegen Pferdeserum bei 2 von 11 Meerschweinchen den tödlichen Schock verhindern, bei einem Teil der übrigen Tiere sahen sie einen abgeschwächten, verzögerten Verlauf. Einen Einfluß auf die passive Anaphylaxie bei Meerschweinchen durch einmalige Blockade mit Tusche iv. (vor der Sensibilisierung injiziert) konnten sie nicht beobachten.

Literaturverzeichnis.

Aschoff, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 1925. — *Bieling*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., **38**, 193. — *Bieling* und *Isaac*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 29, S. 1453; Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **25, 26, 28, 35**. — *Duprez*, Compt. rend. de la soc. de biol. **89**, 420. 1923. — *Klopstock*, Klin. Wochenschr. **4**, Nr. 7, S. 312. 1925. — *Luzzato*, Atti d. reale accad. dei fisiocrit. in Siena **15**, Nr. 4, S. 79. 1924. — *Mautner*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **82**, 116. 1917. — *Meyer*, Zeitschr. f. Hyg. **106**, 124. 1926. — *Moldovan* und *Zolog*, Compt. rend. de la soc. de biol. **89**, 1239 u. 1242. 1923. — *Neufeld* und *Meyer*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 595. 1924. — *Petersen, Jaffe, Levinson* und *Hughes*, Journ. of immunol. **8**, 367. 1923. — *Pico*, Compt. rend. de la soc. de biol. **91**, 1049. 1924. — *Ritz*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., **9**, 321. 1911. — *Schittenhelm* und *Ehrhardt*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **45**, 75. 1925. — *Schmidt*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig., **45**, 496. 1925. — *Siegmund*, Klin. Wochenschr. Nr. 52, S. 2566. 1922. — *Simitch*, Compt. rend. de la soc. de biol. **94**, 23. 1926. — *Steppuhn, Zeiss* und *Brychonenko*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **27**, 206. 1923. — *Testa, Matteo*, Arch. di ostetr. e ginecol. **12**, Nr. 8, S. 337. 1925. — *Zolog*, Compt. rend. de la soc. de biol. **91**, 215. 1924.

(Aus dem Institut „Robert Koch".)

Versuche über passive Anaphylaxie an weißen Mäusen.

Von

O. Schiemann und **Hans Meyer.**

Braun hat 1909 Versuche veröffentlicht, wonach weiße Mäuse sich aktiv nur durch wiederholte Vorbehandlung mit großen Dosen Pferdeserum anaphylaktisch machen ließen, während eine passive Übertragung durch Pferdeantiserum vom Kaninchen nicht gelang. Letztere Beobachtung stimmte mit den Beobachtungen früherer Autoren überein (*Dörr* und *Russ* u. a.), während denselben Autoren auch die aktive Sensibilisierung der Mäuse nicht gelungen war. *Braun* zeigte zugleich, daß Kaninchen sich ähnlich wie weiße Mäuse verhalten und nimmt an, daß zur passiven Übertragung nur schlechte Präcipitinbildner (Meerschweinchen, Mensch) geeignet seien. Später haben *Ritz* und nach ihm *v. Sarnowski* genauere Versuche über die aktive Anaphylaxie bei weißen Mäusen veröffentlicht. Sie erklären für die wichtigste Vorbedingung des Gelingens solcher Versuche die iv. Prüfung. *Ritz* gelang Sensibilisierung mit Dosen von 0,025—0,5 bei einmaliger Vorbehandlung in 50% der Fälle, regelmäßig bei ip. Vorbehandlung mit großen Dosen mehrmals (0,3 und 0,5 Pferdeserum). *v. Sarnowski* erzielte bei einmaliger Vorbehandlung mit 0,025—0,5 ccm fast regelmäßig Anaphylaxie, 0,01 genügte nicht; die Mäuse unterscheiden sich also grundsätzlich von Meerschweinchen dadurch, daß größere Dosen besser sensibilisieren als kleine. Ob die Vorbehandlung sc., ip. oder iv. erfolgte, war gleichgültig. Zur Prüfung genügen nach *v. Sarnowski* 0,025—0,5 ccm Pferdeserum. Bei iv. Vorbehandlung war die Inkubation 10 bis 13 Tage, bei ip. Vorbehandlung schien die Prüfung nach 21 Tagen bessere Erfolge zu geben. Mit zu kleinen Dosen vorbehandelte Mäuse wurden nur leicht krank und waren nach *Ritz* am folgenden Tage antianaphylaktisch; nach *v. Sarnowski* tritt die Antianaphylaxie bereits nach 2 Stunden auf, ist aber nach 8 Tagen fast völlig verschwunden. Diese kurze Dauer der Antianaphylaxie sieht er als Folge davon an, daß bei Mäusen größere Dosen Antigen gut sensibilisieren, während sie beim Meerschweinchen den Eintritt der Anaphylaxie verzögern. Bezüglich der Präcipitinbildung fand *Ritz*, daß die Maus nur wenig Präcipitin gegen Pferdeserum bildet, mehr bei iv. als bei ip. Injektion. Hiernach wäre die Maus also entgegen der Annahme von *Braun* dem Meerschweinchen ähnlicher als dem Kaninchen. *Ritz* stellte auch Versuche mit passiver Anaphylaxie an, die im wesentlichen negativ waren. Seine Übertragungsversuche mit dem Serum sensibilisierter Mäuse auf Meerschweinchen und Mäuse waren stets erfolglos, während seine Versuche, mit Kaninchenantisera passive Anaphylaxie bei Mäusen zu erzeugen, nur gelegentlich zu geringen anaphylaktischen Symptomen, die aber nur gering waren, führten.

Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, wonach es gelingt:

1. durch sc., ip. und iv. Injektion eines Kaninchen-Antipferdeserums weiße Mäuse gegen iv. Injektion von Pferdeserum anaphylaktisch zu machen,

2. den Tod unter anaphylaktischen Symptomen durch iv. Injektion eines Gemisches von Pferdeserum und Antiserum hervorzubringen,

3. die Versuchsanordnung der passiven Anaphylaxie umzukehren, d. h. 24—48 Stunden nach Injektion des Antigens durch Injektion des Antiserums Anaphylaxie hervorzubringen,

4. gelang es, die Überempfindlichkeit gegen Pferdeserum von Maus zu Maus passiv zu übertragen.

Versuche mit passiver Anaphylaxie *an Kaninchen* von *Friedemann* haben gezeigt, daß diese Tiere sich von den Meerschweinchen dadurch wesentlich unterscheiden, daß sie sofort anaphylaktisch werden. *Friedemann* hält auf Grund seiner Versuche weder die Inkubation noch die Antianaphylaxie (die beim Kaninchen wenig ausgesprochen war) für die Anaphylaxie charakteristisch. Denn für wesentlich kann er nicht anerkennen, was nur für eine Tierart gilt. Demnach hält er einen anaphylaktischen Vorgang für erwiesen, wenn ein vorher ungiftiger Körper bei der Reinjektion unter Ausschluß der Summierung giftig wird. Die passive Übertragung der Serumanaphylaxie (iv. Injektion) gelang beim Kaninchen am besten, wenn anaphylaktisches Serum und Antigen gemischt injiziert wurden. Dazu war ein optimales Mischungsverhältnis von anaphylaktischem Serum und Antigen nötig, dann bedurfte es auch kleinerer Antigenmengen (0,025 ccm) als bei getrennter Injektion (2,0 ccm). Wie bei der Präcipitation hebt ein Überschuß von Antigen die Wirkung auf. Wird das anaphylaktische Serum am Tage vorher injiziert, so sind die Symptome undeutlich. Eine vorhergehende Sensibilisierung der Körperzellen durch das anaphylaktische Serum wie beim Theobald-Smithschen Phänomen ist nicht anzunehmen; vielmehr entsteht wahrscheinlich das Gift in der Blutbahn.

Diese Angaben wurden von *Briot* und *Scott* bestätigt. *Dörr* warnt allerdings davor, aus Versuchen mit passiver Anaphylaxie bei Kaninchen prinzipielle Schlüsse zu ziehen. Nach unveröffentlichten Versuchen, die an großen Tierreihen angestellt waren, waren die Ergebnisse sehr inkonstant, das Kaninchen sei nicht geeignet für die Versuchsanordnung.

Nach neueren Versuchen von *Friedberger* und *Seidenberg* soll es auch beim *Meerschweinchen* bei Verwendung eines homologen (besonders hochwertigen) Antiserums gelungen sein, die Tiere sofort (nach 5 Min.) für die Reinjektion von Antigen (Pferdeserum) so empfindlich zu machen, daß sie im anaphylaktischen Schock zugrunde gehen mit typischem Sektionsbefund. Nur bei Verwendung des artfremden Antiserums von Kaninchen soll eine Inkubation dadurch vorgetäuscht werden, daß es hemmend auf den Ablauf der Antikörper-Antigenreaktion einwirke. Ausführliche Protokolle sind bisher nicht veröffentlicht. Die Autoren glauben hiermit die celluläre Theorie der Anaphylaxie widerlegt zu haben. Hiergegen sind Einwendungen erhoben, vor allem aber die tatsächlichen Befunde nicht bestätigt worden. *Schwarzmann*, wie *Dörr* und *Bleyer* konnten mit gut sensibilisierenden Meerschweinchenantisera nur nach längerer Inkubation den anaphylaktischen Schock der Meerschweinchen erhalten. *Dörr* und *Bleyer* fanden außerdem, daß die „auslöschende" Wirkung normalen Kaninchenserums, die sie bei aktiv sensibilisierten Meerschweinchen bestätigen konnten, kein einfach humoraler Vorgang sei, sondern ebenfalls einer Inkubation bedürfe und als „unspezifische

Anaphylaxie" zu deuten sei. Ferner halten sie auch das Intervall von 5 Min. in den Versuchen von *Friedberger* und *Seidenberg* nicht für kurz genug, um celluläre Reaktionen auszuschließen. Nach ihnen „würde die humorale Theorie der Anaphylaxie verlangen, daß auch Gemische der beiden Reaktionskomponenten (unter Vermeidung der als sog. Anaphylatoxinbildung bekannten Giftung des artgleichen Serums!) Schock hervorrufen und daß die Umdrehung der Reihenfolge der Zufuhr (zuerst Antigen, dann Antiserum) ebenfalls ein positives Ergebnis liefert." In diesen beiden Richtungen von den Autoren angestellte Versuche unter Benutzung von Kaninchenantisera waren völlig negativ.

In früheren Versuchen erzielten *Dörr* und *Russ*, wenn sie mit NaCl gewaschenes Präcipitat, das durch Einwirkung präcipitierender Sera auf das Antigen gewonnen war, iv. injizierten, zwar gelegentlich Symptome, jedoch nie akuten Tod, nur wenn das Gemisch von Serum und Antigen 2 Stunden bei 37° und 22 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatte, trat auch bei Meerschweinchen der Tod (mit anaphylaktischem Obduktionsbefund) ein, teils wenn das Präcipitat, teils wenn die obenstehende Flüssigkeit injiziert wurde. Bei der Versuchsanordnung: zuerst Antigen, dann Antiserum (Umkehrung der Anaphylaxie), gelang es *Dörr* und *Russ* nicht, anaphylaktische Symptome zu erhalten. Sie nehmen an, daß nur der Antikörper, nicht das Antigen an die schockempfindlichen Zellen verankert werde.

Opie und *Furth*, die kürzlich am Meerschweinchen mit verschiedenen Antisera Versuche mit umgekehrter Anaphylaxie anstellten, erhielten ebenfalls negative Resultate. Doch geben sie mehr technischen Schwierigkeiten die Schuld: die vom Meerschweinchen gewonnenen Antisera waren nicht hochwertig genug, die heterologen (Kaninchen-) Antisera waren bereits für normale Tiere toxisch. In analogen Versuchen an jungen *Kaninchen* erhielten *Opie* und *Furth* positive Erfolge. Eine Antigeninjektion von 0,05 ccm Pferdeserum iv., 5 ccm ip. genügte, um Tiere von 300—500 g durch iv. Injektion von 8—10 ccm Antiserum anaphylaktisch zu töten. Hier war jedoch eine Inkubationszeit notwendig, die bei iv. Vorbehandlung 4 Stunden betrug. In einem Versuch an 3 erwachsenen Kaninchen von ca. 2500 g, die mit 5 ccm Antigen ip. vorbehandelt waren, erzeugte die Reinjektion von 30 ccm Antiserum tödlichen Schock, 15 ccm Schock mit Erholung, 10 ccm keine Symptome. Die Autoren benutzten zu ihren Versuchen Mischsera von je 4 Tieren. Sie geben an, daß in einem Falle die Mischung von 3 Antipferdesera klar blieb, bei Hinzufügung des 4. Antiserums ein Präcipitat entstand. Die Injektion dieses Mischserums verursachte bereits bei normalen Kaninchen tödliche Anaphylaxie; durch Abzentrifugieren des Präcipitates konnte diese Wirkung ausgeschaltet werden. Ähnliches wurde bei der Mischung von 4 Antirindersera beobachtet. Nach früheren Erfahrungen von *Opie* soll nur im Anfang der Immunisierung das Antigen frei im Blut zirkulieren, bei hoch immunisierten Tieren soll es sofort nach der Injektion verschwinden, das eine von den 4 Antisera stammte demnach von einem nicht hoch immunisierten Tiere und die Beobachtung der Anaphylaxie durch Injektion des Mischserums bei normalen Tieren bildet eine Bestätigung der *Friedemann*schen Angabe, daß beim Kaninchen die iv. Injektion eines Antigen-Antikörpergemisches Anaphylaxie hervorruft.

In einer früheren Arbeit hatte *Opie* gezeigt, daß auch das Arthussche Phänomen sich beim Kaninchen in der Weise hervorrufen läßt, daß zunächst das Pferdeserum iv., danach das Antiserum in die Haut injiziert wird. *Opie* und *Furth* schließen aus ihren Versuchen, daß das Zusammentreffen von Antigen und Antikörper in den empfindlichen Zellen genügt, um die Symptome der lokalen und allgemeinen Anaphylaxie hervorzubringen und daß es unnötig wäre, die plötzliche Bildung einer toxischen Substanz anzunehmen.

Eigene Versuche.

Bevor wir mit der Wiedergabe unserer Versuche beginnen, sei zunächst bemerkt, daß die anaphylaktischen Symptome bei der Maus nicht so stürmisch verlaufen, wie beim Meerschweinchen. Sowohl bei aktiver wie bei passiver Anaphylaxie beginnen die Krankheitssymptome erst ca. 5 Min. nach der Reinjektion. Meist werden die Tiere unruhig, die Haare sträuben sich, nach *v. Sarnowski* ist das erste und bei geringer Wirkung einzige Symptom Augentränen, sie atmen schneller, manchmal werfen sie sich hin und her, gehen aber auch dann nicht so schnell zugrunde wie Meerschweinchen, es dauert meist 15—40 Minuten, auch 60 Min. und länger. Einmal befand sich ein Tier nach heftigen Krämpfen von der 22. bis 69. Min. in Agonie, gewöhnlich aber sind die Krämpfe nicht so heftig, zwischen ihnen bestehen längere Pausen, während deren die Tiere ruhig dasitzen und beim Kriechen Lähmungserscheinungen der Extremitäten, gespreizte Hinterbeine (froschartigen Gang) zeigen. *Ritz* gibt an, daß bei der Obduktion anaphylaktisch verendeter Mäuse die Lungen sich schlechter kontrahierten, als bei Normaltieren, sie erschienen blasser und zeigten vermehrte Konsistenz. Wir fanden nur zuweilen für das Auge wahrnehmbare Emphysemerscheinungen, meist waren jedoch die Lungen eher hyperämisch als blaß, die Konsistenz der Lungen schien uns wohl auch etwas vermehrt, von einem charakteristischen Lungenbefund konnten wir uns aber nicht überzeugen, dagegen fiel uns Blutreichtum von Leber und Milz auf. Wir müssen bei der Maus das Schockgewebe als noch unbekannt erklären.

In unseren Versuchen wurde als Antigen stets Pferdeserum benutzt, das in aktivem Zustande angewendet wurde. Die Reinjektion erfolgte stets iv. Überlebende Tiere wurden fast alle mit 1,0 Pferdeserum nach 2—13 Tagen auf Antianaphylaxie geprüft. Nach den Erfahrungen *v. Sarnowskis* bei aktiver Anaphylaxie mußten hierbei je nachdem, ob der Termin vor oder nach dem 8. Tage gewählt war, Anaphylaxie ausbleiben, oder in Erscheinung treten, bzw. zu dem früheren Termin in geringerem Grade auftreten. Ein derartiges Verhalten mußte für die anaphylaktische Natur der beobachteten Erscheinungen sprechen. Als Antisera standen uns zur Verfügung: Serum Dresden I (Präzip. Titer 1 : 10 000) und Serum Dresden II (Präzip. Titer 1 : 20 000), beide Antipferdesera von den sächsischen Serumwerken, ferner 3 selbstbereitete Antipferdesera 947, 948, 949. Sie wurden nach der von *Otto* und *Shirokaua* angegebenen Methode gewonnen. Bei der Austitrierung am Meerschweinchen ergeben sich für die 3 Sera (Probeentnahme am 6. Tag nach der letzten Pferdeseruminjektion) folgende Titer, (fallende Antiserummengen ip., nach 24 Stunden 0,5 Pferdeserum iv.). 0,2 Antiserum 947 Tod in $3^1/_2$ Min., 0,1 leichte Symptome, 0,5 Antiserum 948 Tod in 5 Min., 0,2 leichte Symptome, 0,5 Antiserum 949 Tod in $3^1/_2$ Min.,

0,2 kaum Symptome. Diese Antisera sind (neben dem Dresdener Serum) in allen Versuchen mit nicht carbolisiertem Antiserum angewendet worden. Am Tage nach dieser Probeentnahme wurden die 3 Tiere entblutet und zu ihrem Serum 0,5% Carbol zugesetzt (carbolisierte Sera in unseren Versuchen). Das carbolisierte Antiserum 947 wurde nach 8 Tagen Aufbewahrung im Eisschrank nochmals am Meerschweinchen austitriert. Es zeigte eine bedeutende Abnahme des Titers. 0,2 des Antiserums präparierte nicht mehr gegen 0,5 Pferdeserum, erst 1,1 Pferdeserum ergab Tod, 1,0 nur schweren Schock, 0,7 keine Symptome.

1. Versuche mit passiver Anaphylaxie.

Tab. 1 gibt Versuche wieder, in denen das Antiserum iv. und 24 Stunden danach das Antigen ebenfalls iv. gegeben wurde. Es zeigte

Tabelle 1. *Versuche mit passiver Anaphylaxie bei iv. Vorbehandlung und iv. Reinjektion nach 24 Std.*

	Maus Nr.	Maus Gewicht g	Vorbehandlung	Reinjektion mit Pferdeserum ccm	Erfolg	2. Prüfung m. 1 ccm Pferdeser. iv. n. Tg.	Erfolg
Versuch 1	1	18	1 ccm Antiser. Dresden I	1	† 26 Min.	·	·
	2	17	0,75 „ „ „ I	1	† 36 „	·	·
	3	17	0,25 „ „ „ I	1	lebt	7	lebt
	4	18	1 „ Pferdeserum Kon-	1	„	7	† 19 Min.
	5	18	0,4 „ „ trolle	1	„	7	† 20 „
Versuch 2	6	19	0,2 „ Antiser. Dresden I	0,1	„	6	lebt
	7	16	0,2 „ „ „ I	0,3	† 58 Min.	·	·
	8	20	0,1 „ „ „ I	0,1	lebt	13	† 16 Min.
	9	18	0,1 „ „ „ I	0,2	„	13	† 17 „
	10	16	0,05 „ „ „ I	0,1	„	6	lebt
Vers. 2a	11	17	0,2 „ „ „ I	0,3	„	7	† 30 Min.
	12	16	0,2 „ „ „ I	0,4	„	7	lebt
	13	16	0,2 „ „ „ I	1	„	7	„
	14	18	0,3 „ „ „ I	1	„	7	„
Versuch 3	15	16	0,3 „ „ „ II	0,3	krank, erholt sich	11	† 14 Min.
	16	17	0,3 „ „ „ II	0,5	desgl.	11	† 22 „
	17	16	0,3 „ „ „ II	1	„	·	·
	18	17	0,3 „ „ „ II	1	† 25 Min.	·	·
	19	18	0,4 „ „ „ II	0,9	† 60 „	·	·
	20	18	unbehandelt	0,9	lebt	11	† 37 Min.
Versuch 4	21	23	1,2 ccm Antiserum 947	1	† 30 „	·	·
	22	22	0,9 „ „ 947	1	† 25 „	·	·
	23	16	0,7 „ „ 947	1	krank, erholt sich	2	lebt
Versuch 5	24	20	1,2 „ „ 948	1	† 30 Min.	·	·
	25	21	1,0 „ „ 948	1	† 15 „	·	·
	26	20	0,9 „ „ 948	1	krank, erholt sich	2	lebt
	27	17	0,7 „ „ 948	1	† 45 Min.	·	·

sich in Versuch 1, daß 1 ccm des Antiserums Dresden I iv. symptomlos vertragen wurde, ebenso 1,2 Antiserum 947 und 948 in den Versuchen 4 und 5. Auch 1,0 Pferdeserum (Versuch 1, Maus 4 ebenso 0,9 Pferdeserum in Versuch 3 Maus 20) werden symptomlos vertragen — nach Tab. 3 (Maus 14) auch 1,8 ccm!

Im ganzen waren bei Prüfung mit 1 ccm Pferdeserum nach 24 Stunden hohe Antiserumdosen zur Präparierung notwendig (Versuch 1. 4 und 5), nur das Antiserum Dresden II in Versuch 3 präparierte in Dosen von 0,3 und 0,4, durch 0,2—0,3 ccm Dresden I wurden keine Symptome erzielt (Maus 3, 13 und 14), Antiserum 947 und 948 wurden nicht in kleineren Dosen als 0,7 angewendet, hier waren 0,7 und 0.9 bereits nicht mehr tödlich. Versuch 3 mit Antiserum Dresden II zeigt, daß auch große *Antigendosen* erforderlich sind, um den Tod herbeizuführen, jedoch bewirkte noch 0,3 ccm Antigen deutliche Krankheitssymptome (Maus 15). Bei Präparierung mit kleinen Mengen Antiserum Dresden I, waren kleine Dosen Antigen ebenso unwirksam wie große (Versuch 2 und 2a), nur 1 mit 0,2 Antiserum vorbehandeltes Tier starb anaphylaktisch nach Reinjektion von 0,3 Pferdeserum (Maus 7), bei Wiederholung dieses Versuches (Maus 11) blieb der Erfolg aus.

Die Probe auf Antianaphylaxie ergab, daß von 2 nach 6 Tagen geprüften Tieren keines anaphylaktisch wurde, von 5 nach 7 Tagen geprüften starb eins (Nr. 11); die übrigen blieben symptomlos. Die Tiere 4, 5 und 20, die nur mit Pferdeserum vorbehandelt waren und nach 7 bzw. 11 Tagen geprüft wurden. starben sämtlich, ebenso wie die nach 11—13 Tagen geprüften Tiere Nr. 8, 9. 15 und 16. Daß nach 11 Tagen keine Antianaphylaxie mehr nachweisbar ist. entspricht den erwähnten Erfahrungen *v. Sarnowskis* bei aktiver Anaphylaxie.

Tabelle 1a. *Intravenöse Präparierung, Reinjektion nach 5—2 Min. iv.*

	Maus		Vorbehandlung	Reinjektion 1 ccm Pferdeser. n. Min.	Erfolg	2. Prüfung m. 1 ccm Pferdeser. iv. n. Tg.	Erfolg
	Nr.	Gewicht g					
Versuch 1	1	18,5	0,2 ccm Antis. 948 (carbolis.)	20	† 25 Min.	·	·
	2	19	desgl.	23	schwer kr., erholt sich	11	† 17 Min.
	3	18,5	„	24	desgl	11	† 19 „
	4	19	„	25	„	11	† 25 „
Versuch 2	5	21	„	5	„	·	·
	6	19	„	5	† 36 Min.	·	·

Tab. 1a zeigt, daß die Maus ähnlich wie das Kaninchen kurz nach iv. Präparierung anaphylaktisch wird. Alle 6 mit 0,2 Antiserum 948 präparierten Mäuse werden durch Reinjektion von 1,0 Pferdeserum schwer krank, 2 Tiere sterben in der gewöhnlichen Zeit. Man gewinnt den Eindruck, daß die Wirkung bei baldiger Prüfung stärker ist, doch

ist gerade für Serum 948 in Tab. 1 nicht die Unwirksamkeit der Präparierung durch kleine Dosen festgestellt worden. Serum 948 wurde in Tab. 1a carbolisiert (durch Zusatz von 0,5 Carbol) verwendet. Carbolsymptome sind bei Injektion in kleinen Mengen geringfügig und von kurzer Dauer. Die Prüfung auf Antianaphylaxie nach 11 Tagen ergab, daß diese — den Erfahrungen in Tab. 1 entsprechend — zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden war.

Tabelle 2. *Passive Anaphylaxie bei sc. Vorbehandlung.*

Maus Nr.	Maus Gewicht g	Vorbehandlung	Prüfung iv. nach 24 Stunden	Erfolg	2. Prüfung m. 1 ccm Pferdeser. nach Tg.	Frfolg
1	15	0,4 ccm Antiserum 947 sc.	0,4 ccm Pferdeser.	ger. Symptome	5	† 25 Min.
2	20	desgl.	1,0 „ „	schwer kr., nach 1 Std. erholt	5	† 37 „
3	20	„	1,4 „ „	etw. krank	5	lebt
4	19	„	1,6 „ „	† 17 Min.	·	·

Tab. 2 gibt einen Versuch mit sc. Vorbehandlung. Hier sind bei Verwendung des Antiserums 947 in der Dosis 0,4 sämtliche geprüften Tiere krank geworden, dem Schock erlag aber nur das mit der größten Antigenmenge geprüfte Tier. Die Prüfung auf Antianaphylaxie nach 5 Tagen ergab, daß von 3 Tieren nur 1 geschützt war. Merkwürdigerweise erlag die bei der 1. Reinjektion schwer kranke Maus (Nr. 2) der Prüfung, während die weniger kranke Maus (Nr. 3), die allerdings bei der 1. Prüfung die höhere Dosis 1,4 erhielt, geschützt war.

Tab. 3 zeigt die Erfolge bei ip. Vorbehandlung mit verschiedenen Antisera, wobei die iv. Reinjektion meist nach 48 Stunden vorgenommen wurde. Nur die Tiere Nr. 36—39 in Versuch 5a, die gleichzeitig mit demselben Pferdeserum, wie die Tiere Nr. 32—35 in Versuch 5 geprüft wurden, sind bereits nach 24 Stunden reinjiziert worden (mit * bezeichnet). In diesen Versuchen sind bereits kleine Antiserummengen von guter Wirksamkeit, zur Prüfung mußten jedoch große Antigenmengen verwendet werden. In Versuch 1 erwies sich das primärtoxische Antiserum 949 (es verursachte bei iv. Injektion in der Dosis 0,7 schwere Lähmungen) in Dosen von 0,2 geeignet, während die doppelte Antiserummenge keinen Erfolg hatte. Aber auch von dem atoxischen Antiserum 947 genügte in Versuch 2 die Dosis 0,4, um Anaphylaxie herbeizuführen, während die Dosis 1,0 nur leichte Symptome hervorrief. In Versuch 3 mit demselben Antiserum zeigt sich auch die Dosis 0,2 wirksam, allerdings nur bei Prüfung mit 1,2 Pferdeserum, die kleineren Dosen 0,6 und 0,8 erzielten an je 2 Tieren nur je 1 mal Erfolg. Die besten

Tabelle 3.

Passive Anaphylaxie bei ip. Vorbehandlung.

Reinjektion nach 48 Std., in Versuch 5a nach 24 Std. (mit * bezeichnet).

Versuch	Maus		Vorbehandlung	Prüfung iv. nach 48 Std. Pferdeser. ccm	Erfolg	2. Prüfung mit 1ccm Pferdeser. iv. (Maus 8 erhielt nur 0,8 ccm Pferdeserum)	Erfolg
	Nr.	Gewicht g					
1	1	18	0,4 ccm Antiserum 949	1,2	lebt	nach 2 Tagen	† 40 Min.
	2	20	0,4 „ „ 949	1,6	„	desgl.	lebt
	3	18	0,4 „ „ 949	2,0	„	„	„
	4	20	0,2 „ „ 949	1,4	† 22 Min.	·	·
	5	26	0,2 „ „ 949	2,0	† 18 „	·	·
2	6	20	0,4 „ „ 947	0,4	lebt	nach 5 Tagen	† 60 Min.
	7	20	0,4 „ „ 947	0,8	etw. krank	desgl.	† 17 „
	8	20	0,4 „ „ 947	1,0	† 39 Min.	·	·
	9	17,5	0,4 „ „ 947	1,2	† 31 „	·	·
	10	18	1,0 „ „ 947	1,0	schwer kr. (üb. 1 Std.)	nach 5 Tagen	lebt
	11	19	1,0 „ „ 947	1,2	etw. krank	desgl.	† 25 Min.
	12	20	1,0 „ „ 947	1,5	schwer kr.	„	lebt
	13	20	1,0 „ „ 947	1,8	desgl.	„	„
	14	23	unbehandelt	1,8	·	„	† 50 Min.
3	15	16	0,2 ccm Antiserum 947	0,6	† 27 Min.	·	·
	16	19	0,2 „ „ 947	0,6	lebt	nach 2 Tagen	lebt
	17	16	0,2 „ „ 947	0,8	† 20 Min.	·	·
	18	17	0,2 „ „ 947	0,8	lebt	nach 2 Tagen	etw. krank
	19	19	0,2 „ „ 947	1,0	krank	desgl.	lebt
	20	18	0,2 „ „ 947	1,2	† 17 Min.	·	·
	21	22	0,2 „ „ 947	1,2	† 21 „	·	·
	22	17	0,4 „ „ 947	1,2	† 16 „	·	·
4	23	19	0,1 „ „ 948	0,6	lebt	nach 2 Tagen	lebt
	24	15	0,1 „ „ 948	0,8	„	desgl.	krank
	25	18	0,1 „ „ 948	0,8	† 15 Min.	·	·
	26	17	0,1 „ „ 948	1,0	† 35 „	·	·
	27	19	0,1 „ „ 948	1,2	† 69 „ (45 „ Agonie!	·	·
	28	18	0,4 „ „ 948	0,6	† 42 Min.	·	·
	29	18	0,4 „ „ 948	0,8	† 23 „	·	·
	30	18	0,4 „ „ 948	1,0	† 19 „	·	·
	31	19	0,4 „ „ 948	1,0	† 36 „	·	·
5	32	16	0.4 „ Antis. 948 (carbol.)	0,4	lebt	nach 3 Tagen	krank
	33	16,5	0,4 „ „ 948 „	0,6	„	desgl.	„
	34	16	0,4 „ „ 948 „	0,7	† 60 Min.	·	·
	35	17	0,4 „ „ 948 „	0,8	† 35 „	·	·
5a	36	17,5	0,4* „ „ 948 „	0,3	lebt	nach 3 Tagen	krank
	37	17	0,4* „ „ 948 „	0,4	† 36 Min.	·	·
	38	18	0,4* „ „ 948 „	0,6	lebt	nach 3 Tagen	lebt
	39	18	0,4* „ „ 948 „	0,7	„	desgl.	„

Resultate ergab das Antiserum 948 (Versuch 4), das bereits in der Menge 0,1 gegen große Dosen Antigen präparierte, in der Menge 0,4 für sämtliche benutzten Prüfungsdosen (0,6—1,8 Pferdeserum) genügte. Die genauere Auswertung dieses Serums in Versuch 5 ergab zwar, daß 0,6 Pferdeserum für die Prüfung nicht regelmäßig genügt, daran trägt aber vielleicht eine Abnahme des Titers des Serums die Schuld, die durch den Carbolzusatz eingetreten sein kann. Versuch 5a zeigt, daß bei Vornahme der Prüfung nach 24 Stunden die Tiere eher schlechter präpariert sind als bei Prüfung nach 48 Stunden.

Die Prüfung auf Antianaphylaxie ergab: nach 2 Tagen 1 Todesfall und 2 mal Symptome unter 8 Prüfungen. Von 5 nach 3 Tagen geprüften Tieren wurden 3 krank, 2 blieben ohne Symptome. Von 6 nach 5 Tagen geprüften Tieren starb die Hälfte, während die zum gleichen Termin geprüfte, nur mit Pferdeserum (1 mal) vorbehandelte Kontrolle (Nr. 14) an Anaphylaxie zugrunde ging. Es scheint bei ip. Präparierung die Antianaphylaxie früher zu verschwinden, bzw. die Absättigung unvollkommener zu sein als bei iv. Präparierung.

2. Versuche mit Injektion eines Pferdeserum-Antiserumgemisches.

In diesen Versuchen wurden Pferdeserum und Antipferdeserum in vitro gemischt und sofort iv. injiziert. Da das benutzte carbolisierte Antiserum 948 nicht ganz klar war, so können geringe Trübungen dem Auge entgangen sein, grobe Präzipitate traten nicht auf.

Die Tab. 4 zeigt, daß bei Anwendung eines Gemisches bereits recht kleine Antigenmengen zur Erzeugung der Anaphylaxie genügen. Da diese kleinen Dosen carbolisierten Serums nur geringfügige Carbolsymptome hervorrufen, die auch nur kurze Zeit andauern (nach 0,2 ccm nur 5 Min.), so konnten auch leichte Krankheitssymptome (wie bei Maus 1 und 6) beobachtet werden. In allen Versuchen, in denen das Gemisch 0,1 Antiserum enthielt, wurden die Mäuse durchweg krank, 6 von 15 starben; bei 0,2 Antiserum starben 4 von 6, ebenso eine mit 0,4 Antiserum (Maus 13), innerhalb dieser Grenzen scheint also die Steigerung der Serumdosen den Erfolg zu erhöhen. Der Einfluß der Antigenmenge ist nicht ganz so deutlich zu erkennen, in Versuch 2 macht sich vielleicht ein Optimum bemerkbar. Die große Dosis 0,8 Pferdeserum führt niemals zu schweren Symptomen, während die Dosis 0,4 unter 4 Prüfungen (Nr. 4, 5, 15 und 16) 2 mal, die Dosis 0,5 jedes Mal (Nr. 17 und 18) den Tod herbeiführt. Daß in Versuch 3, der 9 Tage später ausgeführt wurde, 0,5 Pferdeserum von 2 Tieren 1 nur krank machte, ist vielleicht auf eine weitere Abschwächung des Antiserums durch den Carbolzusatz zurückzuführen. Ein optimales Mengenverhältnis trat bei der Präparierung mit 0,2 ccm nicht hervor.

Die Prüfung auf Antianaphylaxie ergab bei sämtlichen 4 nach 5 Tagen geprüften Tieren Schutz, wenn auch 3 von ihnen erkrankten, während von 7 nach 9 Tagen geprüften Tieren nur 3 überlebten, von diesen hatte 1 Tier (Nr. 1) statt

Tabelle 4. *Injektion eines Antiserum-Antigengemisches.*

Versuch	Maus Nr.	Maus Gewicht g	Simultane Injektion von	Erfolg	2. Prüfung m. 1 ccm Pferdeser. iv. n. Tg.	Erfolg
1	*1	22,5	0,05 ccm carb. Antis. 948 + 0,4 ccm Pf.-S.	leicht kr.	9	lebt (erhielt nur 0,6 ccm)
	*2	22	0,1 „ des gleichen Ser. + 0,2 „ „	krank	9	† 17 Min.
	*3	28	0,1 „ „ „ „ + 0,2 „ „	„	9	† 18 „
	4	25	0,1 „ „ „ „ + 0,4 „ „	„	9	† 15 „
	*5	25	0,1 „ „ „ „ + 0,4 „ „	† 14 Min.	·	·
	*6	25	0,1 „ „ „ „ + 0,8 „ „	leicht kr.	9	lebt
	*7	23	0,2 „ „ „ „ + 0,2 „ „	† 23 Min.	·	·
	*8	20	0,2 „ „ „ „ + 0,4 „ „	krank	9	lebt
	*9	22	0,2 „ „ „ „ + 0,4 „ „	„	9	† 40 Min.
	*10	25	0,2 „ „ „ „ + 0,8 „ „	† 40 Min.	·	·
	*11	20	0,2 „ „ „ „ + 1,0 „ „	† 18 „	·	·
	*12	25	0,2 „ „ „ „ + 1,2 „ „	† 25 „	·	·
	*13	25	0,4 „ „ „ „ + 0,6 „ „	† 22 „	·	·
2	14	17,5	0,1 „ „ „ „ + 0,3 „ „	krank	5	kr., erholt sich
	15	17	0,1 „ „ „ „ + 0,4 „ „	† 36 Min.	·	·
	16	17,5	0,1 „ „ „ „ + 0,4 „ „	krank	5	lebt
	17	18,5	0,1 „ „ „ „ + 0,5 „ „	† 15 Min.	·	·
	18	18,5	0,1 „ „ „ „ + 0,5 „ „	† 30 Min.	·	·
	19	18	0,1 „ „ „ „ + 0,8 „ „	krank	5	krank
	20	18,5	0,1 „ „ „ „ + 0,8 „ „	„	5	„
3	21	16,5	0,1 „ „ „ „ + 0,5 „ „	„	·	·
	22	16,5	0,1 „ „ „ „ + 0,6 „ „	† 40 Min.	·	·
	23	19	0,1 „ „ „ „ + 0,5 „ „	† 20 „	·	·

* Die mit * bezeichneten Tiere hatten eine Infektion mit Pneumokokken nach *aktiver* Imunisierung überstanden.

1,0 nur 0,6 Pferdeserum erhalten. Also auch hier nur ein kurzdauernder Schutz. Bemerkenswert ist, daß bereits sehr geringe Antiserummengen diesen Schutz herbeiführen.

3. Versuche mit „umgekehrter“ Anaphylaxie.

Tab. 5 gibt Versuche mit iv. Vorbehandlung, Tab. 6 mit ip. Vorbehandlung mit Pferdeserum, die Reinjektion mit Antiserum wurde stets iv. vorgenommen, in Tab. 5 nach 24, in Tab. 6 meist nach 48 Stunden. Es zeigt sich ähnlich wie bei den Versuchen von *Opie* und *Furth* am Kaninchen, daß bei dieser Versuchsanordnung große Antiserummengen nötig sind, die carbolisierten Antisera sind daher nicht gut zu verwenden. Zweifellos tritt aber auch bei dieser Versuchsanordnung Anaphylaxie auf.

Bezüglich der Toxizität großer Antiserumdosen verweisen wir auf Tab. 1, aus der hervorgeht, daß, selbst bei intravenöser Injektion, 1,0

Tabelle 5. *Umkehrunq der Anaphylaxie. Vorbehandlung mit Pferdeserum iv., nach 24 Std. Injektion von Antipferdeserum iv.*

Versuch Nr.	Maus Nr.	Maus Gewicht g	Vorbehandlung iv. mit	Prüfung nach 24 Std. iv. mit	Erfolg	2. Prüfung m. 1 ccm Pferdeser. iv. n. Tg.	Erfolg
1	1	19	1,0 ccm Pferdes.	0,7 ccm Antis. Dresden I	lebt	7	lebt
	2	17	0.4 „ „	0,9 „ „ „ I	† 22 Min.	·	·
	3	18	0,3 „ „	0,6 „ „ „ I	† 42 „	·	·
	4	18	0,2 „ „	0,7 „ „ „ I	lebt	7	† 40 Min.
2	5	17	0,1 „ „	0,7 „ „ „ I	† 33 Min.	·	·
	6	15	0,1 „ „	0,5 „ „ „ I	lebt	6	lebt
	7	17	0,1 „ „	0,35 „ „ „ I	„	13	† 22 Min.
	8	19	0,1 „ „	0,2 „ „ „ I	„	13	lebt
	9	16	0,1 „ „	0,1 „ „ „ I	„	13	† 20 Min.
	10	20	0,1 „ „	0,05 „ „ „ I	„	6	lebt
3	11	17	0,1 „ „	0,6 ccm Antiserum 949	† 20 Std.	·	·
	12	18	0,2 „ „	0.6 „ „ 949	† 40 Min.	·	·
	13	16	0,3 „ „	0,6 „ „ 949	† 20 Std.	·	·
	14	16	1,0 „ „	0,3 „ „ 949	† 20 „	·	·
	15	17	1,0 „ „	0,8 „ „ 949	lebt	·	·

Antiserum Dresden I, 1,2 Antiserum 947 und 948 symptomlos vertragen wurden.

In Versuch 1 und 2 mit Antiserum Dresden I sterben 3 von 5 mit größeren Dosen (0,6—0,9) dieses Antiserums reinjizierte Tiere an Anaphylaxie. Von den beiden überlebenden Tieren war Nr. 1 mit 5 mal größerer Pferdeserummenge präpariert worden als Nr. 4, dementsprechend wurde Nr. 4 nicht antianaphylaktisch. Die Antiserumdosen unter 0,7 (Versuch 2) haben bei Präparierung mit 0,1 Pferdeserum nicht Anaphylaxie hervorgerufen.

Die Prüfung auf Antianaphylaxie ergab nach 6 Tagen Schutz, nach 13 Tagen anaphylaktischen Tod bei 2 Mäusen (unter 3). Die Anaphylaxie ist hier wohl auf aktive Sensibilisierung zurückzuführen und würde damit die Beobachtung *v. Sarnowskis* bestätigen, daß auch kleine Pferdeserummengen bei einmaliger Injektion Mäuse anaphylaktisch machen.

In Versuch 3 ist das primär toxische Antiserum 949 verwendet worden, es erregte 1 mal Anaphylaxie (Maus 12), die späten Todesfälle, die auch keine typischen Symptome, nur Lähmungserscheinungen, zeigten, sind nicht als anaphylaktisch anzusehen. Hier scheint durch vorherige Behandlung der Maus mit Pferdeserum die Toxizität des Antiserums erhöht zu werden, da früher 0,6 ccm noch ohne Lähmungen und Tod ertragen wurden. Merkwürdigerweise überlebte eine mit 1,0 Antigen vorbehandelte Maus die größte hier versuchte Menge des Serums 949, 0,8 ccm. Dieses Tier konnte nicht auf Antianaphylaxie geprüft werden, da die Reinjektion mißlang.

Tabelle 6. *Umgekehrte Anaphylaxie. Vorbehandlung mit Pferdeserum ip. nach 48 Std. (in Versuch 5a nach 24 Std.) Injektion von Antipferdeserum iv.*

Versuch	Maus Nr.	Maus Gewicht g	Vorbehandlung ip. mit	Prüfung nach 48 Std. iv. mit	Erfolg	2. Prüfung m. 1 ccm Pferdeser. iv. n. Tg.	Erfolg
1	1	18	0,4 ccm Pf.-S.	0,7 ccm Antiserum 947	lebt	2	lebt
	2	18	0,4 „ „	1,0 „ „ 947	† 24 Min.	•	•
	3	19	1,5 „ „	0,6 „ „ 947	lebt	2	lebt
	4	18	1,5 „ „	1,0 „ „ 947	† 16 Min.	•	•
	5	20	1,5 „ „	1,0 „ „ 947	† 22 „	•	•
2	6	18	0,4 „ „	0,7 „ carb. Antiser. 947	lebt	2	lebt
	7	19	1,5 „ „	0,4 „ „ „ 947	„	2	„
	8	20	1,5 „ „	0,6 „ „ „ 947	„	2	„
3	9	17	0,4 „ „	0,6 „ Antiserum 948	† 18 Min.	•	•
	10	18	0,4 „ „	1,0 „ „ 948	† 45 „	•	•
	11	18	0,4 „ „	1,0 „ „ 948	† 30 „	•	•
	12	17	0,4 „ „	1,0 „ „ 948	† 28 „	•	•
	13	18	1,5 „ „	0,7 „ „ 948	† 20 „	•	•
	14	19	1,5 „ „	0,9 „ „ 948	† 31 „	•	•
4	15	18	0,4 „ „	0,6 „ carb. Antiser. 948	† 19 „	•	•
	16	17	0,4 „ „	1,0 „ „ „ 948	an Carbol † in $^1/_2$ Min.	•	•
5	17	18	1,5 „ „	0,4 „ „ „ 948	† 32 Min.	•	•
	18	15,5	0,4 „ „	0,2 „ „ „ 948	lebt	3	krank
	19	17,5	0,4 „ „	0,4 „ „ „ 948	„	3	krank. (ip. geprüft)
	20	16,5	0,4 „ „	0,6 „ „ „ 948	„	3	† 16 Min.
	21	17	0,4 „ „	0,7 „ „ „ 948	„	3	krank (ip. geprüft)
5a	22	17	0,4 „ „	0,2 „ „ „ 948 (nach 24 Std.)	„	3	krank
	23	16	0,4 „ „	0,4 ccm carb. Antiser. 948	„	3	lebt
	24	16,5	0,4 „ „	0,4 „ „ „ 948	† 73 Min.	•	•
	25	17	0,4 „ „	0,6 „ „ „ 948	lebt	3	lebt

Wie früher (Nr. 3) bei der passiven Anaphylaxie, so ergab auch bei der Umkehrung die ip. Präparierung mit Pferdeserum die besten Resultate. Es zeigt sich, daß 2 Tage nach ip. Injektion des Antigens die Mäuse noch gegen iv. Injektion von Antiserum empfindlich sind. Wie lange diese Empfindlichkeit andauert, wurde bisher nicht untersucht. Es mußten von Antiserum 947 1,0 ccm injiziert werden, 0,4 bis 0,7 blieben ohne Erfolg. Antiserum 948 erzielte in den Versuchen 3 und 4 auch in kleinen Mengen (bis 0,4 abwärts) stets Erfolg. In den späteren Versuchen 5 und 5a (letzterer mit Applikation des Antiserums bereits nach 24 Stunden) erweist sich das Serum nicht mehr so wirksam. Ob der Carbolzusatz an dieser Abschwächung des Serums Schuld war, kann nicht unterschieden werden. In Versuch 4 erscheint das Antiserum

trotz Carbol wirksam, Versuch 5 und 5a sind aber 9 Tage später gemacht.

Das Antigen wurde in 2 verschiedenen Mengen (0,4 und 1,5 ccm) gegeben, ein Einfluß dieser Variierung auf den Erfolg ist aus den Versuchen nicht zu entnehmen.

Die Prüfung auf Antianaphylaxie ergab bei sämtlichen 5 nach 2 Tagen geprüften Tieren völlige Desensibilisierung, von den nach 3 Tagen geprüften waren nur 2 völlig geschützt, von den übrigen 5 starb eines, 4 wurden krank, erholten sich aber (bei 2 von diesen war die iv. Reinjektion mißlungen, so daß die Reinjektion ip. erfolgte).

4. *Passive Übertragung der Anaphylaxie mit homologem Blut oder Serum.*

Angesichts der Mißerfolge von *Ritz* haben wir die Übertragung der Anaphylaxie nur mit dem Blut 3mal mit großen Dosen Pferdeserum sensibilisierter Mäuse versucht.

Im ganzen erhielt jeder Blutspender 1,3 ccm Pferdeserum ip. an 3 Immunisierungstagen mit 3tägigen Intervall. 8 Mäuse (a—h, Tab. 7) wurden in dieser Weise behandelt und 3, 5, 7 und 12 Tage nach der 3. Pferdeserum-Einspritzung Blut entnommen. Am 12. Tage wurden die Mäuse entblutet, vorher erfolgten die Entnahmen aus dem Schwanze in der von *Meyer* (Zeitschr. f. Hyg. 1926, **106**, S. 124) angegebenen Weise,

Tabelle 7. *Prüfung dreier von den 8 Blutspendern (des in Tab. 8 geprüften Mausblutes bzw. Serums sensibilisierter Mäuse) auf aktive Anaphylaxie und Übersicht über die Blutentnahmen von allen 8 Tieren.*

Alle 8 Mäuse werden 3mal ip. mit Pferdeserum vorbehandelt. Sie erhalten das 1. Mal 0,3 ccm Pferdeserum, dann 2mal in 5tägigem Intervall 0,5 ccm. Die große Dosis 0,5 ccm wird jedesmal auf 2 Injektionen verteilt. Zu dem angegebenen Termin nach der letzten Injektion des Pferdeserums erfolgt Blutentnahme aus dem Schwanz bzw. Entbluten der Tiere.

Maus		Blutentnahmen nach der letzten Injektion				Prüfung auf Anaphylaxie am 5. Tage		Prüfung auf Antianaphylaxie	
	Gewicht g	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen	nach 12 Tagen	ccm Pf.-S. iv.	Erfolg	1,0 ccm Pferde-Ser. iv.	Erfolg
a	18	Mischblut von Maus a, b, c	0,1 ccm Schwanzblut	·	·	0,4	lebt	n. 11 Tag.	† 21 Min.
b	19		„	·	·	0,6	† 23 Min.	·	·
c	18		„	·	·	0,8	† 20 Min.	·	·
d	18	·	·	Mischblut von Maus d, e, f	Mischserum von Maus d, e, f, g, h (durch Entbluten gewonnen)	·	·	·	·
e	19	·	·			·	·	·	·
f	17	·	·			·	·	·	·
g	18	·	·	Mischserum von Maus g u. h		·	·	·	·
h	18	·	·			·	·	·	·

Tabelle 8. *Prüfung von Blut und Serum aktiv sensibilisierter Mäuse im passiv anaphylaktischen Versuch durch iv. Injektion in normale Mäuse.*
Der Zeitpunkt der Blutentnahme ist in der 1. Spalte angegeben. M. Bl. = Mischblut, E. Bl. = Einzelblut, M. S. = Mischserum. Die Blutspender sind in Versuch 2 angegeben, sonst aus Tab. 7 ersichtlich.

	Maus		Präpariert ip. m. Mausblut od. Serum ccm	Pf.-S. iv. nach 48 Std. ccm	Erfolg	Prüfung auf Antianaphylaxie	
	Nr.	Gewicht g				1,0 ccm Pferde-Ser. iv.	Erfolg
Versuch 1 v. 3. Tg. M. Bl.	1	20	0,1	0,4	lebt	n. 13 Tag.	† 63 Min.
desgl.	2	19	0,1	0,6	schwer krank, erholt sich	desgl.	† 25 Min.
desgl.	3	19,5	0,1	0,8	† 18 Min.	·	·
Vers. 2 v. 5. Tg. E. Bl. (M. a)	4	17	0,1	0,4	lebt	n. 12 Tag.	† 25 Min.
„ 2 „ 5. „ „ „ (M. b)	5	18	0,1	0,6	lebt	desgl.	schwer krank, erholt sich
„ 2 „ 5. „ „ „ (M. c)	6	18,5	0,1	0,8	† 20 Min.	·	·
Versuch 3 v. 7. Tg. M. Bl.	7	18	0,07	0,5	lebt	n. 11 Tag.	lebt
desgl.	8	17	0,07	0,6	† 34 Min.	·	·
„	9	21	0,07	0,7	schwer krank, erholt sich	n. 11 Tag.	schwer krank, erholt sich
Versuch 3a v. 7. Tg. M. S.	10	20	0,1	0,4	lebt	desgl.	† 12 Min.
desgl.	11	20	0,1	0,6	lebt	„	† 14 Min.
Versuch 4 v. 12. Tg. M. S.	12	18	0,2	0,6	krank, erholt sich	n. 2 Tag.	lebt
desgl.	13	17	0,2	0,8	desgl.	desgl.	lebt
„	14	16	0,2	1,0	† 31 Min.	·	·
„	15	17	0,2	1,0	† 40 Min.	·	·
„	16	14	0,1	1,0	krank, erholt sich	n. 2 Tag.	krank, erholt sich

indem das Blut aus der Schwanzwunde mit einer 0,1 ccm 1 proz. Citratkochsalzlösung enthaltenden Pipette aufgefangen wurde. Die in der Tab. 8 angegebenen Blutmengen sind auf den wirklichen Blutgehalt berechnet. Am 5. Tage nach der Sensibilisierung der Blutspender wurden 3 von ihnen (Maus a, b, c, Tab. 7) auf aktive Anaphylaxie und zugleich ihr Blut, das vorher entnommen wurde, auf seine präparierende Kraft geprüft (Tab. 8, Versuch 2). Hierbei wurde nicht Mischblut, wie in den übrigen Versuchen, verwendet, sondern das Blut jeder Maus für sich einer normalen Maus injiziert. Aus dem Vergleich der beiden Versuche geht hervor, daß Maus c, die bei Prüfung mit 0,8 Pferdeserum anaphylaktisch starb, in 0,1 ccm ihres Blutes genügend Antikörper enthielt, um eine normale Maus gegen die gleiche Dosis Pferdeserum zu präparieren, während in 0,1 ccm von Maus b, die aktiv

ebenfalls gut sensibilisiert war, nicht mehr genügend Antikörper vorhanden war, um gegen 0,6 Pferdeserum zu präparieren. Die Maus enthält also reichlich Antikörper in ihrem Blut. Auch wenn man die Gesamtergebnisse betrachtet, gewinnt man den Eindruck, daß der Gehalt des Mäuseblutes an anaphylaktischen Reaktionskörpern nach längerer Sensibilisierung nicht geringer ist als bei der als gute Antikörperbildner geltenden Kaninchen. Daß Dosen von 0,4 und 0,5 Pferdeserum zu gering sind bei Prüfung passiv präparierter Mäuse, ergaben auch die Versuche mit ip. Präparierung durch Kaninchenserum 948 Tab. 3. Bei Prüfung mit Pferdeserumdosen zwischen 0,6 und 1,0 blieb in Tab. 8 von 12 Tieren nur 1 ohne Symptome, 5 starben, 6 erholten sich von ihrem Schock. Das Antiserum (bzw. Blut) wurde nur in den Grenzen 0,07—0,2 variiert, wobei sich keine wesentlichen Differenzen ablesen lassen. Bezüglich der günstigsten Entnahmezeit lassen sich ebenfalls keine Schlüsse aus unseren Versuchen ziehen, ausgenommen, daß nach 12 Tagen bei unserer Vorbehandlungsmethode noch reichlich Antikörper vorhanden sind. Aus dem Vergleich der Ergebnisse von Versuch 3 und 3a könnte man schließen, daß Blut mehr Antikörper enthält als Serum, jedoch könnten hier individuelle Verschiedenheiten eine Rolle spielen. Daß auch das zellfreie Serum den Reaktionskörper überträgt, geht aus Versuch 4 hervor.

Bei einem Tier wurden auch durch simultane Injektion eines Gemisches von 0,1 ccm Citratblut einer in gleicher Weise aktiv sensibilisierten Maus und 0,7 Pferdeserum in die Schwanzvene schwere anaphylaktische Symptome erzielt; allerdings überlebte die Maus.

Allgemeine Ergebnisse.

Betrachten wir unsere Gesamtergebnisse, so ist es uns zunächst gelungen, eine Lücke unserer Kenntnisse über die Mäuseanaphylaxie dadurch auszufüllen, daß wir auch passive Anaphylaxie bei Mäusen hervorrufen konnten. Die Übertragung gelang sowohl mit Serum und Blut aktiv sensibilisierter Mäuse, als auch durch Verwendung eines Antiserums von Kaninchen. Erstere Versuche wurden nur mit ip., letztere auch mit sc. und iv. Präparierung ausgeführt.

Bezüglich unserer weiteren Beobachtungen ist zu sagen, daß wir in Übereinstimmung mit *Braun* geneigt sind, einen Gegensatz zwischen Meerschweinchen einerseits, Maus und Kaninchen andererseits anzunehmen, allerdings nicht als ob, wie *Braun* das annimmt, Kaninchen und Maus ungeeignet wären für passive Übertragung der Anaphylaxie, sondern in dem Sinne, daß, wie *Friedemann* für das Kaninchen gezeigt hat, ein anderer Mechanismus des anaphylaktischen Vorganges als beim Meerschweinchen anzunehmen ist. *Friedemann* hat bereits nachgewiesen, daß bei Kaninchen eine Latenzperiode der passiven

Anaphylaxie fehlt, vielmehr auch bei Injektion eines Antiserum-Antigengemisches der Schock zustande kommt. Er hat daraus den Schluß gezogen, daß die Bildung des „anaphylaktischen Giftes" in der Blutbahn stattfinde, ohne daß eine vorherige Verankerung des Antikörpers an schockempfindliche Zellen wie beim Meerschweinchen nötig sei. Nach unseren Versuchen wird auch die Maus kurz nach Injektion des Antiserums anaphylaktisch empfindlich, und auch bei der Maus läßt sich durch Injektion eines Antiserum-Antigengemisches tödliche Anaphylaxie herbeiführen. Beim Meerschweinchen ist (unter Verwendung von Kaninchenantisera) bisher von allen Untersuchern die Notwendigkeit einer Inkubationszeit (von 4—7 Stunden) festgestellt worden. Zwar geben *Friedberger* und *Seidenberg* an, mit homologem Antiserum auch Meerschweinchen in 5 Min. genügend präpariert zu haben, um anaphylaktischen Tod zu erzielen, doch sollen nach *Dörr* und *Bleyer* 5 Min. Inkubation bereits für eine celluläre Reaktion genügen. In unseren Versuchen an Mäusen war übrigens auch bei Verwendung heterologen Antiserums die Inkubationszeit nicht länger als 5 Min. Anaphylaktischer Tod endlich durch Injektion eines Antiserum-Antigengemisches, wie bei *Friedemanns* Kaninchen und unseren Mäusen ist bei Meerschweinchen bisher nicht erzielt worden. Ein anderer zu fordernder Beweis für die humorale Natur der Entstehung der anaphylaktischen Noxe wäre nach *Dörr* und *Bleyer* die Möglichkeit der Umkehrung der anaphylaktischen Versuchsanordnung. Auch diese Anordnung ist nach *Opie* und *Furth* bei Kaninchen, nach unseren Versuchen bei Mäusen ausführbar. Allerdings haben wir diesen Versuch nicht bei verkürzter Zeit der Reinjektion ausgeführt; *Opie* und *Furth* fanden, daß in diesem Falle bei Kaninchen eine Inkubationszeit von 4 Stunden notwendig war.

Aber auch abgesehen von den erörterten Fragen der Verschiedenartigkeit der Gesetze der Anaphylaxie bei verschiedenen Tierarten und der Beweise für die celluläre oder humorale Theorie, die aus den Beobachtungen abzuleiten wären, ergeben sich noch andere Fragen aus der Beobachtung, daß eine Umkehrung der Anaphylaxie möglich ist. Bisher galt nach *Dörr* die inverse Anaphylaxie in Form des Forssmannschen Experimentes als einzige Möglichkeit einer umgekehrten Anaphylaxie. Nachdem sich erwiesen hat, daß bei Kaninchen und Mäusen eine gewisse Zeit nach erstmaliger Einführung des Antigens Verhältnisse vorliegen, unter denen die Einführung des Antikörpers als tödliches Gift wirkt, erscheint es wichtig zu untersuchen, wann und durch welche Veränderungen dieser gefährliche Zustand beseitigt wird. Denn daß diese Überempfindlichkeit gegen den Antikörper mit der Zeit verschwinden muß, geht daraus hervor, daß die Tiere nach einiger Zeit Antikörper in ihrer Blutbahn enthalten, ohne Krankheitssymptome zu zeigen.

Schlußsätze.

1. Durch ip. Übertragung von Blut und Serum aktiv mit Pferdeserum sensibilisierter weißer Mäuse läßt sich passive Anaphylaxie bei der gleichen Tierart hervorrufen.

2. Auch mit Antipferdeserum vom Kaninchen wurde durch ip., sc. und iv. Vorbehandlung weißer Mäuse passive Anaphylaxie erzielt.

3. Bei iv. Präparierung war bereits nach 5 Min. der Schock hervorzurufen; auch bei Injektion eines Antiserum-Antigengemisches iv. trat er ein.

4. Auch durch iv. oder ip. Präparierung mit Pferdeserum und iv. Reinjektion von Antiserum nach 24 bzw. 48 Stunden ließ sich Anaphylaxie erzeugen (umgekehrte Anaphylaxie). Bei dieser Versuchsanordnung wurde die Inkubationszeit nicht festgestellt.

5. Die geprüften Mäuse wurden den Beobachtungen von *v. Sarnowski* bei aktiver Anaphylaxie entsprechend nur für kurze Zeit antianaphylaktisch.

Literaturverzeichnis.

Braun, Münch. med. Wochenschr. 1909, S. 1880. — *Briot*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1910, S. 402. — *Dörr*, Kolle-W., 2. Aufl., Bd. II. 1913; Weichhardts Ergebnisse **1**. 1914 und **5**. 1922. — *Dörr* und *Russ*, Z. f. I. **3**, 181 u. 706. — *Dörr* und *Bleyer*, Zeitschr. f. Hyg. **106**, 371. 1926. — *Friedberger* und *Seidenberg*, Klin. Wochenschr. 1925, S. 1823. — *Friedemann*, Z. f. I. **2**, 591. 1909. — *Opie* und *Furth*, Journ. of exp. med. **43**, 469. 1926. — *Otto* und *Shirokawa*, Zeitschr. f. Hyg. **103**, 426. 1924. — *Ritz*, Z. f. I. **9**, 321. 1911. — *v. Sarnowski*, Z. f. I. **17**, 577. 1913. — *Scott*, Journ. of pathol. a. Bacteriol. **15**, 31. 1911. — *Schwarzmann*, Zeitschr. f. Hyg. **106**, 119. 1926.

(Aus dem Odessaer Staatlichen Bakteriologischem Institut.
Direktor: Prof. *Stschastny*.)

Der Nachweis des Vaccinevirus im Blute durch Blockade des Reticuloendothels.[1])

Von
Priv.-Doz. Dr. **E. Hoen**, Dr. **L. Tschertkow** und Dr. **W. Zipp.**

Die Frage der Generalisation des Vaccinvirus ist heute noch nicht völlig gelöst, während für die Variola vera festgestellt ist, daß das Virus sich durch das Blut im ganzen Organismus verbreitet.

Gins und *Weber*, auf deren Arbeit wir bezüglich der übrigen Literatur verweisen, konnten nach intravenöser Injektion großer Mengen von Vaccine (bis 50 ccm in Verdünnung 1 : 20) nach Ablauf von 1 bis 5 Stunden das Virus nicht mehr im Blute nachweisen, während es in den Organen, hauptsächlich in der Milz, zu derselben Zeit vorhanden war. Nach Ablauf von 24 Stunden konnte das Virus nirgends mehr aufgewiesen werden.

Auch verschiedenen anderen Forschern ist es zuweilen gelungen. das Vaccinvirus in den inneren Organen nachzuweisen, während die Bemühungen, dasselbe im Blute zu finden, stets erfolglos blieben. Nur *Othaware* hat experimentell das Virus im Blute nachgewiesen, indem er zu diesem Zwecke eine besonders empfindliche Methode, nämlich die Verimpfung in den Hoden des Kaninchens benutzte.

Nun ist uns der Nachweis des Vaccinvirus im Blute, und zwar an durch die Haut infizierten Tieren, ohne Verimpfung in die Hoden gelungen. Das schnelle Verschwinden des Virus aus dem Blute und sein verhältnismäßig leichter Nachweis in den Organen des retikulendothelialen Apparates, hauptsächlich in der Milz, brachte uns auf den Gedanken, daß die Retikuloendothelien das Virus aus dem Blut entziehen und daß, falls es gelingen würde ihre Tätigkeit herabzusetzen. man darauf rechnen könnte, das Virus im Blute zu finden. Zur teilweisen Blockierung des genannten Systemes benutzten wir Tusche. die hauptsächlich von den retikul-endothelialen Zellen der Leber und Milz aufgenommen wird. Eine 3 proz. Lösung von Tusche „Pelikan"

[1]) Nach einem Vortrag, gehalten in der Sitzung der Wissenschaftlichen ärztlichen Konferenz des Odessaer Bakteriologischen Institutes am 4. V. 1926.

wurde Kaninchen intravenös zu je 25 ccm injiziert. Die Tusche wurde 5 mal zu je 5 ccm im Laufe von $2^1/_2$ Tagen einverleibt. 4—5 Stunden nach der letzten Injektion erhielt das Kaninchen eine Hautimpfung auf die rasierte und excoriierte Oberfläche des Rückens. Die geimpfte Oberfläche betrug 5×5 qcm. Zur Infektion diente eine Glycerinverreibung in einer Verdünnung 1 : 5, welche wir bei uns für Impfungen von Menschen benutzten. Die Menge des in die Haut verriebenen Materials betrug ungefähr 0,5 ccm. Zur Kontrolle wurden andere Tiere ohne jegliche Vorbehandlung geimpft. Die Entwicklung der Pockenpusteln und Schorfe bei den einen sowie den anderen zeigte keinen besonderen Unterschied.

Um das Virus im Blute nachzuweisen, entnahmen wir in den nächsten Tagen nach der Impfung aus einer Ohrvene je 4—5 ccm Blut, das in einem Reagenzglas mit 1 ccm 3 proz. Lösung Natri Citrici aufgefangen und intravenös einem frischen Kaninchen injiziert wurde; diesem rasierten wir eine kleine Hautfläche aus und machten auf ihr leichte Einschnitte mit der Impffeder. Das Verfahren wurde unter solchen Bedingungen ausgeführt, daß jede Möglichkeit einer Infektion dieser Hautstelle auf irgendeine andere Art auszuschließen war. Wir entnahmen für unsere Untersuchungen das Blut von den infizierten und vorher blockierten ebenso wie auch von den Kontrollkaninchen erst vom 2. Tage nach der Infektion an. In all jenen Fällen, wo wir das Blut von blockierten Kaninchen am 2. und 3. Tage nach der Hautinfektion auf frische Kaninchen verimpften, konnte kein einziges Mal eine Pusteln- und Schorfbildung auf der excoriierten Haut nachgewiesen werden. *Dagegen ergab das am 4. Tage von blockierten Tieren entnommene Blut eine Pusteln- und Schorfbildung bei 2 von 6 infizierten Kaninchen und das am 5. Tage entnommene ergab in allen Fällen positive Resultate. Das Blut des Kontrollkaninchens rief überhaupt keine Pusteln- und Schorfbildung hervor.*

Um die Spezifizität des vaccinalen Ausschlages zu bestätigen, nahmen wir am 4. Tage die gebildeten Schorfe von der Haut, zerrieben sie mit Glycerin und impften dieses Material Meerschweinchen auf die Haut. In allen Fällen beobachteten wir am 3. Tage bei den Meerschweinchen einen ergiebigen Ausschlag von Pockenpusteln.

Die Versuche ließen also erkennen, daß der retikulo-endotheliale Apparat eine spezifische Beziehung zum Pockenvirus hat, indem er das Virus bei seinem Eintreten in das Blut an sich reißt. Ein teilweises Blockieren des retikulo-endothelialen Apparates schwächt dessen adsorbierende Eigenschaften ab und ermöglicht das Vaccinvirus im Blute nachzuweisen. Diese Beobachtung erklärt von einem neuen Standpunkte aus die Ergebnisse von *Prowazek* und *Miyaji*, nämlich, daß das Pockenvirus bei Einbringen in die Bauchhöhle des Kaninchens

nur bis zu 4 Stunden nachgewiesen werden kann. Dagegen kann bei einem Kaninchen, welchem vorher in die Bauchhöhle sterile Bouillon eingeführt war, das Virus im leukocytenreichen Peritonealexsudate noch nach 5 Stunden gefunden werden. Auf Grund dieses Versuches kann man die Meinung gewinnen, daß es sich in diesem Falle um eine verminderte Aufnahmefähigkeit des Endothels des Bauchfelles handelt, welche durch die vorherige Einspritzung der Bouillon hervorgerufen wurde.

Auf diese Weise sehen wir, daß bezüglich der Generalisation zwischen dem Virus der Variola vera und dem Vaccine virus kein prinzipieller, sondern nur ein quantitativer Unterschied vorhanden ist. Bei einem reichlichen Auftreten im Blut bleibt nämlich der Überschuß des Virus, nachdem es den retikulo-endothelialen Apparat gesättigt hat, frei, so daß er im zirkulierendem Blute nachgewiesen werden kann. Das spezifische Verhalten des retikulo-endothelialen Apparates zum Vaccinevirus läßt uns annehmen, daß bei der Entstehung der Immunität nicht nur die Haut, sondern auch der retikulo-endotheliale Apparat beteiligt ist.

(Aus der Seuchenabteilung des Instituts „Robert Koch". — Leiter: Prof. *B. Lange.*)

Die Bedeutung der Disposition für Entstehung und Verlauf von Seuchen.

Epidemiologische und experimentelle Beobachtungen gelegentlich einer unter Versuchstieren herrschenden Stallseuche.

Von

Dr. R. Freund,

ehemals Assistent am Institut.

Mit 2 Textabbildungen.

Klinische und epidemiologische Erfahrungen haben von jeher darauf hingewiesen, daß dauernde oder zeitlich begrenzte Schädigungen, die die Widerstandsfähigkeit des Menschen herabsetzen, wie ungesunde Wohnung, mangelhafte Ernährung, ungünstige Witterung, körperliche und geistige Erschöpfung auf Entstehung und Verlauf von Epidemien einen nicht geringen Einfluß gewinnen können. Auch für Entstehung und Verlauf vieler tierischer Seuchen wird nach dem Urteil erfahrener Tierärzte gewissen, die allgemeine Resistenz herabsetzenden Schädigungen, wie langen Bahntransporten, schlechten Unterkunfts- und Ernährungsbedingungen, Abkühlungen und Durchnässungen eine gewisse Bedeutung zugemessen*).

Trotz dieser Erfahrungen aus der Praxis hat man früher, wohl unter dem Eindruck der großen Entdeckungen auf bakteriologischem Gebiet, die Wirkungen der Krankheitserreger, ihre Verbreitung, ihre Menge und Virulenz vielfach als *die allein ausschlaggebende Ursache der Epidemien* angesehen. Erst in neuerer Zeit macht sich auch bei den Bakteriologen in dieser Beziehung ein Wandel der Anschauungen bemerkbar. Neben neueren klinischen und epidemiologischen Beobachtungen sind es nicht zum wenigsten Erfahrungen des Laboratoriumsexperimentes, die zu einer Abkehr von der streng bakteriologischen Auffassung geführt haben.

Die alten Laboratoriumsversuche mit Verimpfung von Reinkulturen pathogener Mikroorganismen auf parenteralem Wege werden nicht mehr als unbedingt beweiskräftig angesehen. Wesentlich anders gestaltet sich die Wirkung im Laboratorium an verschiedenen Versuchstieren

*) Vgl. die Bemerkungen von *B. Lange* in der Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 48.

ausgeführter Infektionen, *die den natürlichen Infektionsbedingungen angepaßt sind*. Hier beobachten wir nicht so selten, daß selbst größere Mengen hochvirulenter Erreger, gesunden Tieren von den natürlichen Eingangspforten aus beigebracht, ganz *erfolglos* sind. Selbst bei Erregern, die bei einer Tierart unter natürlichen Verhältnissen zu ausgedehnten spontanen Epidemien führen können, finden wir überraschenderweise eine sehr ungleichmäßige, von Rasse, individueller Konstitution, zeitlich begrenzten Schwankungen der Resistenz abhängige Empfänglichkeit. Sehr lehrreich sind in dieser Beziehung die neuesten Untersuchungen amerikanischer und englischer Autoren [*Webster*, *Amoss*, *Pritchett*, *Topley* u. a.*)] über natürliche Infektionen von Mäusen mit Mäusetyphusbacillen.

Seit einigen Jahren ist auch im hiesigen Institut auf experimentellem Wege versucht worden, ein Verständnis der für natürliche Epidemien maßgebenden Faktoren anzubahnen. Dieses Ziel verfolgen die Arbeiten von *B. Lange* und seinen Mitarbeitern. *Lange*, *Keschischian*, *Nowoselsky***) und *Uchida* haben Mäuse und Meerschweinchen mit abgestuften Mengen hochvirulenter Septicämieerreger, Mäusetyphus-, Rotlauf-, Milzbrandbacillen, den Erregern der Pasteurellagruppe, Pneumokokken und Streptokokken von den natürlichen Eingangspforten (Haut, Verdauungstraktus, Lungen) aus infiziert. Sowohl in bezug auf Angehen und Nichtangehen der Infektion, wie auch in bezug auf den Verlauf der experimentell erzeugten Erkrankung traten wesentliche Unterschiede gegenüber der künstlichen, parenteralen Infektion zutage. Solche „natürlichen" Infektionen ermöglichten es, den Einfluß einer Reihe von Faktoren abzuschätzen, welche nach allen Erfahrungen für den Ablauf natürlicher Epidemien wesentliche Bedeutung haben, wie im besonderen Virulenz und Menge der Erreger, die Widerstandsfähigkeit des Gesamtorganismus und seiner Eintrittspforten der Infektion gegenüber.

Die Beobachtung einer im Frühjahr 1925 unter Kaninchen und Meerschweinchen des Institutes ausbrechenden Stallseuche gab uns nun Gelegenheit, die Erfahrungen über einige Seuchenerreger im Laboratoriumsexperiment mit der Wirkung ebendieser Erreger *unter den natürlichen Bedingungen einer Epidemie* zu vergleichen und manche wichtige Voraussetzungen natürlicher Epidemien näher kennenzulernen.

Vorbemerkungen.

Bevor ich mit der Schilderung der Stallseuchen beginne, über die *B. Lange* bereits kurz berichtet hat***), muß ich einige zum Verständnis des Nachfolgenden notwendige Bemerkungen machen.

*) Literatur bei *Neufeld*, Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 9.
**) Literatur siehe *B. Lange*.
***) Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 48.

Betroffen von der Seuche waren sämtliche Stallräume des Instituts für kleinere Versuchstiere. Die Seuchen, über die hier berichtet wird, spielten sich in den beiden Ställen ab, in denen die Meerschweinchen und Kaninchen der Seuchenabteilung untergebracht waren, einem geräumigen hellen Raum, der 153 Käfige faßte, im 1. Stock des Hauptstallgebäudes (Stall I) und einem zu ebener Erde gelegenen Notstall (Stall II), in dem sich 119 Käfige und ferner noch 3 Boxen befanden. Dieser Stall II bot den Tieren eine wesentlich schlechtere Unterkunft, weil seine Mauern mehrfach durch Holztüren durchbrochen und die Fenster nur klein, sehr hoch gelegen und unbequem zu öffnen sind. Die Holztüren hatten früher dazu gedient, den im Stall untergebrachten größeren Versuchstieren den Austritt in eingefriedigte Plätze vor dem Stallgebäude zu gestatten. Die Beheizung beider Ställe geschieht durch eine im Institutsgebäude gelegene zentrale Dampfheizungsanlage. Beide Ställe haben Zementfußboden, der Stall I nur eine, der Stall II dagegen 2 einander gegenüberliegende Türen. Die Käfige sind 60 × 45 × 42 cm groß, ihr Boden ist aus Eisenblech, die Wände aus Drahtgitter.

Die über einige Wintermonate fortgesetzte Kontrolle der Lufttemperaturen in den beiden genannten Ställen mittels Maximum-Minimum-Thermometer hat ergeben, daß *bei ununterbrochener Beheizung* der Ställe (auch nachts) im Stall I die Temperatur zwar einigermaßen gleichmäßig ist, aber häufiger zu hohe Temperaturen erzielt werden (über 20° C); im Stall II liegt das Temperaturmaximum wesentlich tiefer, hier wurden aber oft starke Temperaturschwankungen beobachtet (Differenz zwischen Maximum und Minimum bis zu 8° am Tage!), auch fand ziemlich häufig gegen Morgen ein starkes Absinken der Temperatur, z. B. auf 5° C, statt.

Es ist beachtenswert, daß selbst bei kontinuierlicher Beheizung der Ställe schon gewisse hygienische Nachteile hervortreten, ein Übelstand, der mit der sehr verbesserungsbedürftigen Heizanlage zusammenhängt.

I. Die Kaninchenseuche.

Diese Seuche, von früheren Beobachtern (*Beck*, *R. Kraus*) wegen der Ähnlichkeit mit der menschlichen Influenza auch als „influenzaartige" Kaninchenseuche bezeichnet, brach aus unter 16 Tieren, die am 11. III. 1925 von zwei Händlern in augenscheinlich gutem Gesundheitszustande an das Institut geliefert, sofort in 2 Boxen des Stalles II untergebracht wurden. Etwa die Hälfte der Tiere wurde an dem gleichen Tage durch Injektion von Tuberkelbacillen in die vordere Augenkammer infiziert. Schon am 12. III., einen Tag nach ihrer Einlieferung, zeigten zwei Drittel der Tiere Schnupfen und Conjunctivitis, am 13. III. fand man 4 verendet, die übrigen litten sämtlich an mehr oder weniger hochgradigem Ausfluß aus der Nase und eitrigem Bindehautkatarrh. Innerhalb der nächsten 6 Tage starben weitere 8 Kaninchen, bald darauf auch die letzten 4 Tiere. Bei der Sektion sämtlicher verendeter Tiere fand sich starke Rhinitis, Conjunctivitis, hämorrhagische Tracheobronchitis, fibrinös-eitrige Pleuritis und bronchopneumonische Herde in den Lungen. Aus Herzblut, Lungen und Milz wurden in sämtlichen Fällen gram-negative bipolare Stäbchen gezüchtet, die ihrer Morphologie, ihrem kulturellem Verhalten und ihrer hohen Virulenz für Mäuse und Meerschweinchen nach als Bacillen der hämorrhagischen Septicämie (bac. lepisepticus, Hühnercholera, Pasteurellavirus) festgestellt wurden.

Der Beginn der Erkrankungen mit Schnupfen, die durch die Sektion nachgewiesene, fast könnte man sagen, elektive Erkrankung des ganzen Respirationstraktus, läßt daran denken, daß *Nasenrachenraum bzw. Lungen die Haupteintrittspforte* der Septicämieerreger darstellen.

Im Stall II waren nun außer den erwähnten 16 Kaninchen in den Boxen z. Z. der Seuche noch 8 Kaninchen — auf 6 Käfige verteilt — untergebracht. Diese Tiere blieben gesund. Eine 4 Wochen nach Beginn der Kaninchenseuche bei ihnen vorgenommene Untersuchung des Nasenschleims (Entnahme mittels Platinöse, Kultur auf Blutplatten) ergab in keinem Fall bipolare Stäbchen; auch eine am nächsten Tage vorgenommene Wiederholung der Prüfung verlief ganz negativ.

Am 12. V. wurde sämtlichen 8 Tieren je 1 Tropfen 1 proz. Argentum-nitricum-Lösung in das linke Nasenloch geträufelt. Der Erfolg dieser Schleimhautschädigung war überraschend. Am 14. bzw. 15. V. verendeten 3 Kaninchen an hämorrhagischer Septicämie, von den überlebenden 5 Tieren fanden sich im Nasenschleim bei 2 Tieren Pasteurellabakterien (Nachweis durch Ausstrichpräparate und Kultur). Nach einer 2. Reizung der Nasenschleimhaut durch Senföl am 23. V. wurden noch 2 weitere Kaninchen positiv.

Diese Beobachtung ist insofern wichtig, als sie zeigt, daß bei der gewöhnlichen Untersuchung des Nasenschleims auf pathogene Mikroorganismen gewonnene negative Resultate wenig beweisen. Im vorliegenden Fall sind mindestens 7 von den 8 untersuchten Kaninchen Keimträger gewesen, die Pasteurellabakterien waren aber offenbar in so geringer Zahl und vielleicht auch so versteckt in der Nasenhöhle vorhanden, daß ihr kultureller Nachweis erst gelang, als sie infolge der Schleimhautschädigung Gelegenheit fanden, sich zu vermehren. Ferner sehen wir daraus, daß derartige harmlose Epiphyten der Schleimhaut nach einer Schädigung derselben schwere septische Erkrankungen verursachen können.

Wir haben in epidemiefreien Zeiten mehrfach sporadische Fälle von Kaninchensepticämie beobachtet, für die ein Zusammenhang mit früheren Erkrankungsfällen oder auch Beziehungen zueinander nicht nachgewiesen werden konnten. Offenbar sind die Erreger als Epiphyten der normalen Schleimhaut bei Kaninchen sehr verbreitet. In diesem Sinne sprechen auch die Beobachtungen von *Webster*, dem es nur unter bestimmten künstlichen Bedingungen gelang, Kaninchen aufzuziehen, die *nicht* Träger des Bac. bipolaris waren.

II. Die Meerschweinchenseuchen (Pasteurellose, Pneumokokken- und Paratyphussepsis).

Die Epidemie des Jahres 1925 beginnt Ende März, die ersten Vorläufer finden sich allerdings schon Anfang dieses Monats. Der Höhepunkt fällt in den Ausgang April, Ende Mai erlischt sie. Vom 8. III.

bis 30. V. 1925 kamen unter den Tieren der Abteilung 226 Todesfälle an Seuchen vor. Die Verteilung der Todesfälle auf die einzelnen Wochen ist aus der Abb. 1 ersichtlich. Der tägliche Bestand an Meerschweinchen während der Epidemiezeit sank niemals in stärkerem Maße ab, da stets neue Versuchstiere eingestellt wurden; er betrug während der Monate März bis April 200 bis 250 pro Tag, nur während des Mai fiel er auf 145.

Im April und Mai wurde bei den meisten verendeten Meerschweinchen eine genaue bakteriologische Untersuchung vorgenommen (Organausstriche, Kultur- evtl. Tierversuch). Auf diese Weise wurden für die Zeit vom 29. III. bis 23. V. festgestellt: 141 Todesfälle an Pasteurellose, 37 an Pneumokokkensepsis, 7 tödliche Paratyphus-B-Erkrankungen. Bei 15 von den 141 Fällen der ersten Gruppe fand sich eine Mischinfektion, und zwar wurden 12 mal in inneren Organen gleichzeitig Pasteurellabakterien und Pneumokokken, 2 mal bipolare Stäbchen und Paratyphusbakterien nachgewiesen. In 1 Fall von Pasteurellainfektion fand sich in den Lungen ein tuberkulöser Primäraffekt als Zeichen aerogener Spontaninfektion mit Tuberkelbacillen.

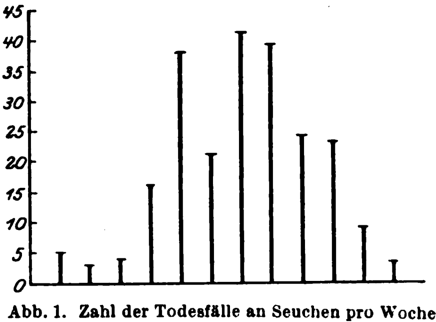


Abb. 1. Zahl der Todesfälle an Seuchen pro Woche (vom 8. III. bis 30. V. 1925).

Seuchen unter Meerschweinchen sind bekannt und mehrfach beschrieben worden (von *Weber*, *Busson*, *B. Thomas* u. a.). Es muß noch erwähnt werden, daß es bei einer Reihe von Tieren, die während der

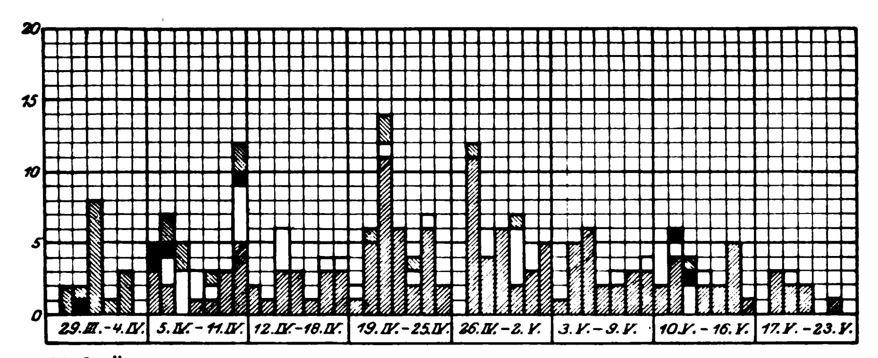


Abb. 2. Übersicht über die Todesfälle an Pasteurellose, Pneumokokken- und Paratyphus-B-Sepsis vom 29. III. bis 23. V. 1925.

Bakteriologisch nicht näher untersuchte Fälle, bzw. Fälle, bei denen ein Erreger nicht festgestellt werden konnte; wahrscheinlich meist Pasteurellose.
Tod an hämorrhagischer Septicämie (Pasteurellose).
Tod an Pneumokokkensepsis.
Tod an Paratyphus-B-Infektion.

Seuchenperiode starben, nicht gelungen ist, durch Nachweis eines Erregers die Ätiologie aufzuklären.

Eine Übersicht über den Verlauf der einzelnen Seuchen und die täglichen Todesfälle gibt Abb. 2.

a) Die örtlichen und zeitlichen Beziehungen der Seuchenfälle zueinander.

Die Verteilung der Seuchentodesfälle auf die Unterbringungsräume war nicht gleichmäßig. Von den im Stall I untergebrachten Meerschweinchen starben an den oben bezeichneten Seuchen 27%, im Stall II dagegen 50%, also fast doppelt so viel. Das Verhältnis der einzelnen Infektionskrankheiten zueinander in den beiden Stallräumen ist annähernd dasselbe.

Von den 94 Käfigen beider Ställe, in denen Meerschweinchen untergebracht waren, blieben 26, also fast ein Viertel, verschont von Spontanerkrankungen. Es ist beachtenswert, daß es sich bei diesen fast durchweg um Käfige handelt, in denen wenige Tiere (1—3, höchstens 4) untergebracht waren. Unter den 68 von Seuchen befallenen Käfigen hatten 36, also über die Hälfte, 6 Meerschweinchen und mehr zur Aufnahme gedient. In 7 dieser überfüllten Käfige starben sämtliche Meerschweinchen nacheinander an derselben Seuche, und zwar an hämorrhagischer Septicämie. Außer in diesen 7 Behältnissen war noch in 15 weiteren der 68 Käfige die Ätiologie der in ihnen vorkommenden Seuchenfälle einheitlich; es handelte sich dabei nur 4 mal um Pneumokokkeninfektion, in allen anderen Fällen um Pasteurellose. In 46 Käfigen, also in etwa zwei Drittel, kamen während der Epidemiezeit Todesfälle von mindestens zwei der genannten Seuchen vor, meist Pasteurellose mit Pneumokokkensepsis vergesellschaftet.

Ein Zusammenhang der zeitlich aufeinanderfolgenden Todesfälle einer bestimmten Seuche ließ sich meistens nicht nachweisen. Nur für die Pasteurellose war ein solcher Zusammenhang stellenweise anscheinend vorhanden, besonders in den schon erwähnten Fällen, wo in ein und demselben Käfig mehrere Tiere hintereinander an Pasteurellasepsis verendeten. In der Regel war aber die zeitliche Aufeinanderfolge der Erkrankungen einer Seuche unabhängig von der Örtlichkeit. Die Seuche verlief sprungweise. Besonders auffallend war das Verschontbleiben einiger Käfige zwischen anderen stark verseuchten. Z. B. befanden sich in der untersten Reihe von Käfigen des Stalles II 2 Käfige, die besonders heimgesucht wurden. In dem einen starben 11 von 12 Meerschweinchen an Pasteurellose, in dem anderen 7 von 10 an der gleichen Infektion. Die zwischen diesen beiden Käfigen befindlichen 2 Behältnisse enthielten zur Zeit der Seuche in der nächsten Nachbarschaft 8 und 10 Meerschweinchen. Von diesen 18 Meerschweinchen starben 5 an Pneumokokkensepsis, *kein einziges an Pasteurellose.* Auffallend war ferner der Umstand, daß mehrfach gesunde zu den kranken gesetzte Meerschweinchen dauernd gesund blieben. Wir haben dieses Experiment während des Fortschreitens der Seuchen 12 mal wiederholt, in der Regel mit dem gleichen negativen Resultat. Nur in 2 Fällen starben die zugesetzten Tiere (und zwar beide) wie die früheren Insassen an einer Seuche (hämorrhagische Septicämie).

In den beiden in Betracht kommenden Käfigen waren, als die 2 gesunden Tiere zugesetzt wurden, 4 bzw. 6 Meerschweinchen krank, 2 bzw. 3 einige Tage vorher an Pasteurellose verendet. Es starben dann zunächst die alten, erst einige Tage später die neu hinzugekommenen Tiere. Man könnte in diesen beiden Fällen an eine echte Ansteckung gesunder Tiere seitens der kranken Stallgenossen denken, muß allerdings auch berücksichtigen, daß die zusammen untergebrachten Meerschweinchen auch in der Regel gleichartigen äußeren Schädigungen (z. B. Zugluft, Überwärmung usw.) ausgesetzt gewesen sind.

b) Untersuchungen auf Keimträger.

Während der Epidemiezeit litt über die Hälfte der noch lebenden Tiere an Schnupfen. Es zeigte sich nun, daß diese erkrankten Tiere zu einem nicht geringen Teil Keimträger waren. Wir haben bei 100, größtenteils an Schnupfen leidenden Meerschweinchen aus unseren Ställen kurz nach dem Erlöschen der Epidemie, zum kleineren Teil während der letzten Epidemiezeit das Nasensekret bakteriologisch untersucht (Entnahme des Sekretes mittels Platinöse, Ausstrich auf Objektträger, Kultur auf Blutplatte, in einem Drittel der Fälle intraperitoneale Verimpfung auf weiße Mäuse) Von den 100 Tieren wurde die Untersuchung 65 mal intra vitam, 35 mal post mortem bei den zum Zweck genauerer Untersuchung der inneren Organe getöteten Meerschweinchen vorgenommen. Unter 100 Tieren fanden wir 29 Keimträger. 19 mal wurden Pneumokokken, 6 mal Pasteurellabakterien, 3 mal Pneumokokken und Pasteurellabakterien, 1 mal Paratyphus-B-Bakterien im Nasenschleim festgestellt. In 52 Fällen fanden sich auf der Blutplatte grünwachsende, seltener hämolysierende Streptokokken. Die kulturelle Verarbeitung der wichtigsten Lymphknoten *bei den 35 ad hoc getöteten Meerschweinchen* Anfang Juni d. Js. ergab 2 mal Pneumokokken, 3 mal bipolare Stäbchen der Pasteurellagruppe in den *Trachealdrüsen*. Niemals wurden pathogene Keime in Hals- oder Mesenterialdrüsen gefunden. Die Tiere mit positivem Befund der Trachealdrüsen führten sämtlich die entsprechenden Keime, und zwar in reichlicher Menge, auch im Nasensekret. Sämtliche Meerschweinchen von den 100 untersuchten, bei denen im Nasensekret die Seuchenerreger gefunden wurden, mit Ausnahme von 2 Pneumokokkentieren hatten Ausfluß aus der Nase. Übrigens ergab die weitere Beobachtung der an Schnupfen erkrankten Meerschweinchen, daß der größere Teil derselben (über drei Viertel) später an einer der aufgeführten Seuchen zugrunde ging. Bei den als Keimträger ermittelten Tieren, die später verendeten, entsprach der post mortem erhobene bakteriologische Befund dem intra vitam festgestellten.

Auch unter 18 von drei verschiedenen Händlern bezogenen Meerschweinchen fanden wir am Tage ihrer Einlieferung ins Institut Anfang Mai 5 Keimträger. (Von 5 Tieren Händler S. 2 mal Pneumokokken, 1 mal Bacillus bipolaris, von 5 Tieren Händler P. 1 mal Pneumokokken, von 8 Tieren Händler G. 1 mal Bacillus bipolaris.)

Eine weitere Untersuchung auf Keimträger fand etwa $^1/_2$ Jahr nach Ablauf der Epidemie statt. Es wurden 34 Meerschweinchen, die 1 bis 4 Monate im Versuch standen, aber von der betreffenden Infektion nicht erkrankt waren (es handelte sich hauptsächlich um Milzbrand- und Tuberkuloseversuche), getötet, der Nasenschleim dieser Tiere und die Lymphknoten (Halsdrüsen, Trachealdrüsen, Mesenterialdrüsen) in Ausstrichpräparaten und durch Kultur sorgfältig untersucht. Es fanden sich im Nasensekret nur 1 mal Pasteurellabakterien, 9 mal Pneumokokken fast durchweg bei Tieren, die geringen Ausfluß aus der Nase hatten, sonst Strepto- und Staphylokokken. Während Hals- und Mesenteriallymphknoten sämtlicher 34 Tiere sich als steril erwiesen, fanden wir in den Trachealdrüsen 2 mal Pneumokokken, bei einem dieser beiden Tiere waren Zeichen abgeheilter Pneumonie und Pleuritis vorhanden, bei dem anderen die Organe o. V. Beide Tiere litten an Schnupfen und hatten auch Pneumokokken im Nasensekret.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Nasenschleims, die in der Tabelle noch einmal zusammengestellt sind, zeigen eine hohe Zahl von Keimträgern. Von insgesamt 152 untersuchten Tieren waren nicht weniger als 44, also fast ein Drittel, positiv.

Tabelle. *„Keimträger" auf Grund der Nasenschleimuntersuchung gegen Ende der Epidemie und $^1/_2$ Jahr nach derselben.*

Zeitpunkt der Untersuchung	Zahl der untersuchten Tiere	Pneumokokken	Befund im Nasensekret		
			Pasteurella	Pneumok. u. Past.	Paratyphus-B
I. Ende der Epidemie	100	19	6	3	1
	18*)	3	2		
II. $^1/_2$ Jahr nach der Epidemie	34	9	1	—	—
im ganzen:	152	31	9	3	1

Bemerkung: Die atypischen Pasteurellastämme (im ganzen 5) sind in der Tabelle nicht berücksichtigt.

*) Von verschiedenen Händlern frisch bezogene Tiere. (Vgl. S. 633 unten.)

Ein Versuch, durch Instillation von Argentum nitricum-Lösung oder von Senföl bei Meerschweinchen eine Reizung der Nasenschleimhäute und der Conjunctiva zu erzeugen, hatte keinen Erfolg. Wenn wir von den an Kaninchen gemachten Erfahrungen auf die Meerschweinchen schließen dürfen, so stellen die oben für die Keimträger gewonnenen Zahlen *Minimalwerte* dar. Im besonderen möchten wir für die Pneumokokken und Paratyphus-B-Bakterien eine viel weitere Verbreitung unter anscheinend gesunden Tieren annehmen, als aus den obigen Feststellungen hervorzugehen scheint. Es sprechen ja auch andere Erahrungen dafür, daß die beiden genannten Bakterien weitverbreitete Epiphyten

der normalen Schleimhaut sind (Paratyphusbakterien allerdings wohl hauptsächlich Bewohner des Darmes). Wenn ihr Nachweis nicht häufiger gelingt, so beruht das offenbar darauf, daß die normale Schleimhaut über die Fähigkeit verfügt, die in Rede stehenden Bakterien in ihrer Entwicklung zu hemmen.

Die Tatsache, daß bei der Untersuchung der Lymphknoten in den positiven Fällen die Erreger *nur in den Trachealdrüsen* gefunden wurden, spricht entschieden dafür, *daß die Lungen als die wichtigste Eingangspforte für Pneumokokken und Pasteurellabakterien anzusehen sind.*

c) *Kulturelles Verhalten und Virulenz der aus Seuchenfällen und von Keimträgern gewonnenen Stämme der Seuchenerreger.*

20 von verschiedenen Meerschweinchen isolierte Pneumokokkenstämme, und zwar sowohl die Keimträger- wie die Seuchenstämme erwiesen sich ohne Unterschied in Galle gut löslich. Die Optochinempfindlichkeit war eine hohe (Entwicklungshemmung entsprechend Optochinkonzentrationen von 1 : 400000 bis 1 : 1 600000). Die Ergebnisse der Agglutination mit Seris des Typus 1, II und III waren nicht eindeutig. Eine stärkere Beeinflussung der geprüften Stämme durch eins der 3 Seren wurde jedenfalls nicht beobachtet.

Die Pathogenität für Mäuse war bei 10 Stämmen von spontan eingegangenen Tieren eine mittlere bis geringe. Nur 2 der Stämme töteten ip. noch in Menge von $^{1}/_{100}$ ccm, die anderen 8 mit $^{1}/_{10}$ ccm, mit $^{1}/_{1000}$ ccm nicht mehr. Auch nach Verimpfung von $^{1}/_{10}$ ccm (1 Milliarde Keime!) erfolgte der Tod meist erst nach 2 Tagen, bei einem Stamm sogar erst nach 4 Tagen.

Die von Keimträgern gewonnenen Stämme verhielten sich ganz ähnlich.

Eine Virulenzprüfung mehrerer teilweise aus spontanen Seuchenfällen, teilweise von Keimträgern isolierter Pneumokokkenstämme gegenüber Meerschweinchen hatte folgendes Ergebnis. Die Pneumokokkenstämme (i. g. 8) hatten sämtlich eine auffallend geringe Virulenz bei parenteraler Verimpfung. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Keimträger- und den Seuchenstämmen war nicht regelmäßig nachweisbar. Im großen und ganzen war das Resultat der Verimpfung der Keimträgerstämme noch unsicherer als bei den Seuchenstämmen. Bei 2 dieser Stämme tötete nicht einmal 1 ccm Reinkultur sämtliche mit dieser Dosis subcutan und intraperitoneal infizierte Meerschweinchen. Dabei zeigten sich oft starke Unterschiede in der natürlichen Resistenz bei den einzelnen Tieren. Es kam einmal vor, daß ein Meerschweinchen bei Infektion mit $^{1}/_{1000}$ ccm subcutan nach 3 Tagen erlag, während die mit 0,5 ccm, $^{1}/_{10}$ und $^{1}/_{100}$ ccm subcutan infizierten Tiere gesund blieben. In einem anderen Fall — es handelt sich beidemal um „Seuchenstämme“ — überlebten 2 mit

$^1/_{10}$ ccm Kultur subcutan infizierte, während von 2 mit $^1/_{1000}$ ccm geimpften eins nach 5 Tagen an Pneumokokkensepsis starb, das andere überlebte (vgl. auch die Beobachtungen von *B. Lange* und *Uchida*: Zeitschr. f. Hyg. **106**, 297).

12 aus Seuchenfällen isolierte und *kulturell* näher geprüfte Stämme des *Bacillus bipolaris septicus* (Pasteurellavirus, Hühnercholerabacillus) zeigten übereinstimmend das für den Bacillus der hämorrhagischen Septicämie charakteristische Verhalten. 4 von Keimträgern mit leichtem Katarrh der Nasenschleimhaut isolierte Stämme waren ebenfalls in jeder Beziehung typisch, nur die Indolbildung war bei einem der Stämme lediglich angedeutet. Dagegen fanden wir bei 5 weiteren Keimträgerstämmen (2 aus Nasensekret, 3 aus Trachealdrüsen) ein atypisches Verhalten. Sämtliche Stämme wuchsen auf Serumbouillon nur spärlich und bildeten nach 2—3tägiger Bebrütung krümeligen Bodensatz in klarer Bouillon. Ein Versuch, diese 5 Stämme auf künstlicher Kultur fortzuzüchten, mißlang. Das Wachstum riß nach 2—4 Bouillonpassagen plötzlich ab (vgl. hierzu die Beobachtungen von *Killian*).

Ein Vergleich mit einigen aus Fällen von Kaninchensepticämie gewonnenen Stämmen ergab keinerlei kulturelle Unterschiede zwischen den Meerschweinchen- und Kaninchenseuchenstämmen. Es sei bemerkt, daß auch in bezug auf die Virulenz für Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen irgendwie erhebliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen von Pasteurellastämmen nicht festgestellt werden konnten.

Was die *Virulenz* der *aus Seuchenfällen* von Kaninchen und Meerschweinchen gewonnenen Kulturen betrifft, so war sie bei intraperitonealer Verimpfung auf Meerschweinchen gewöhnlich eine maximale bzw. sehr hohe. Von 5 Meerschweinchenstämmen hatte nur einer eine etwas abgeschwächte Virulenz. Er tötete zwar noch in einer Menge von $^1/_{100\,000}$ ccm — kleinere Dosen wurden bei diesem Stamme nicht untersucht — aber der Tod an Sepsis trat erst nach 4 Tagen ein. Alle anderen Stämme töteten noch in Mengen von $^1/_{100\,000}$—$^1/_{100\,000\,000}$ ccm Reinkultur innerhalb von 1—2 Tagen.

Gegenüber diesen Seuchenstämmen war die Virulenz der *Keimträgerstämme* untereinander recht verschieden und mehrfach stark abgeschwächt. Es gab Stämme, die noch in Menge von $^1/_{100\,000}$ ccm ip. innerhalb von 24 Stunden Meerschweinchen töteten (Stamm 581 und 601). Ein Stamm, der sich kulturell ganz typisch verhielt, war für Meerschweinchen avirulent: nicht einmal 1 ccm Bouillonkultur, intraperitoneal injiziert, hatte Erfolg, ein anderer tötete zwar noch in einer Dosis von $^1/_{1000}$, aber nicht mehr in Mengen von $^1/_{100\,000}$ ccm ip., ein dritter Stamm tötete zwar in Mengen von $^1/_{100}$ ccm und $^1/_{100\,000}$ ccm, die so infizierten Tiere starben aber nicht innerhalb 24 Stunden, sondern das erste nach 4 Tagen, das zweite, mit der kleineren Dosis geimpfte, nach 2 Tagen.

Als der gleiche Stamm 3 Tage später noch einmal geprüft wurde, erwies er sich als ganz avirulent Meerschweinchen gegenüber, Mäuse tötete er noch mit $^1/_{100}$ ccm, mit $^1/_{100000}$ ccm nicht mehr. Bei einem weiteren Stamm endlich erwies sich die Virulenz für Meerschweinchen gleichfalls als abgeschwächt, insofern als $^1/_{10000}$ ccm Reinkultur ip. verimpft zwar noch tötete, aber auffallend spät, nämlich erst nach 7 Tagen. Der letzte Stamm wurde von der Nasenschleimhaut eines Meerschweinchens $^1/_2$ Jahr nach Ende der Epidemie gezüchtet. Mit den oben erwähnten 5 atypischen Pasteurellastämmen wurde eine Virulenzprüfung nicht angestellt.

Zur Zeit der Seuche und mehrere Monate später haben wir nun noch Stämme des Bacillus bipolaris septicus kulturell und auf ihr tierpathogenes Verhalten geprüft, die aus den Lungen von 2 gesunden durch Sanocrysin getöteten Schafen und 2 infolge Tuberkulose verendeten Rindern gezüchtet waren. Es sei bemerkt, daß wir schon bei früherer Gelegenheit von gesunden und tuberkuloseinfizierten Schafen typische Stämme des Erregers der hämorrhagischen Septicämie züchten konnten. Die Stämme, die sich kulturell typisch verhielten, hatten Mäusen und Meerschweinchen gegenüber eine recht verschiedene Virulenz. Der Stamm K. 30 war für Mäuse avirulent, ein mit $^1/_{10}$ ccm ip. infiziertes Meerschweinchen überlebte, auffallenderweise starb das mit $^1/_{10\,000}$ ccm infizierte nach 3 Tagen. Nach einer Meerschweinchenpassage hatte der Stamm an Virulenz noch etwas eingebüßt, auch bei der Prüfung dieser Passagekultur zeigte sich die größere Dosis ($^1/_{10}$ ccm) ip. unwirksam, die kleine ($^1/_{10\,000}$ ccm) tötete nach 12 Tagen. Es fand sich bei dem so spät gestorbenen Tier eine schwere fibrinös eitrige Peritonitis mit massenhaft bipolaren Stäbchen. Der Stamm K. 31 tötete Mäuse noch mit $^1/_{10}$ ccm, mit $^1/_{10\,000}$ ccm nicht mehr; $^1/_{10}$ ccm auf ein Meerschweinchen verimpft war wirkungslos, $^1/_{10\,000}$ ccm tötete nach 3 Tagen. Dieses höchst merkwürdige Verhalten, daß manchmal eine Keimmenge wirksam ist, die tausendmal größere dagegen nicht, scheint eine Eigentümlichkeit gewisser Pasteurellastämme abgeschwächter Virulenz zu sein. Der Stamm Sch. 7 war für Mäuse hochvirulent, ein mit $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur geimpftes Meerschweinchen starb nach 3 Tagen, das mit $^1/_{10\,000}$ ccm geimpfte überlebte. Der Stamm Sch. 5 war sowohl Mäusen wie Meerschweinchen gegenüber avirulent.

Diese Beobachtungen sprechen für eine geringe Virulenz derartiger an einem fremden Wirtsorganismus angepaßter Stämme für Meerschweinchen, andernfalls zeigen sie, wie beträchtlich die Unterschiede in der Virulenz bei solchen Stämmen sind. Es sei noch bemerkt, daß uns ein Virulentmachen der avirulenten Septicämiestämme durch Tierpassage in einigen Versuchen weder für Mäuse noch für Meerschweinchen gelungen ist.

Vier von Paratyphussepsis des Meerschweinchens isolierte Paratyphus-B-Stämme verhielten sich kulturell und nach ihrer Virulenz für Mäuse wie echte Breslau-Stämme. Die Virulenz dieser beiden Stämme für Meerschweinchen war bei parenteraler Verimpfung eine sehr hohe (vgl. die 3. Mitteilung von *Uchida*).

d) Versuche, gesunde Meerschweinchen mit den Seuchenerregern von den natürlichen Eingangspforten aus zu infizieren.

Für die Beurteilung der Ursachen der beschriebenen Kaninchen- und Meerschweinchenendemien sind nun die von *B. Lange* und *Uchida* mit den aus Fällen der Endemie gezüchteten Erregern angestellten *natürlichen Infektionen an Kaninchen und Meerschweinchen* sehr wesentlich. Bezüglich der Ergebnisse sei auf die Mitteilungen von *Lange* und *Uchida* verwiesen. Hier soll nur ganz kurz über das Resultat berichtet werden. Mit den Erregern der Kaninchensepticämie konnten gesunde Kaninchen per os und von der Conjunctiva aus nur mit enorm großen Keimmengen (1—2 Tropfen Reinkultur) infiziert werden. Auch bei Meerschweinchen gelang die Infektion mit Kulturen der gleichen Septicämieerreger oder mit Organsaft, welcher diese Erreger reichlich enthielt, sowohl von der unverletzten Haut aus wie per os nur, wenn sehr große Keimmengen (z. B. 0,5 ccm) angewendet wurden. Die Infektion von den Lungen aus gelang bisweilen mit einigen tausend Keimen, aber nicht einmal mit 100000 Keimen und darüber regelmäßig. 1000 Keime werden aber *unter natürlichen Infektionsbedingungen* niemals in die Lungen eindringen. In der Praxis handelt es sich vielmehr immer nur um einzelne wenige Keime (vgl. die Beobachtungen von *B. Lange* und *Keschischian* u. a.). Auch für Kontaktinfektionen kommt eine Übertragung derartig großer Keimmengen — 0,5 ccm Reinkultur entspricht etwa 1—5 Milliarden Keime — wohl nur ausnahmsweise einmal in Betracht. Völlig negativ verliefen Versuche, mit den aus spontanen Seuchen gewonnenen Pneumokokken in Reinkultur oder in Organsaft auf natürlichem Wege Meerschweinchen zu infizieren, auch natürliche Infektionsversuche mit Paratyphus-B fielen — selbst mit enormen Keimmengen in der Regel negativ aus. Daß unter ganz übertriebenen Bedingungen Verfütterung von Paratyphus-B-Bakterien Meerschweinchen krank machen kann, wissen wir aus den Untersuchungen von *Kutscher* und *Meinicke* und *Ornstein**).

e) Die Verbreitung der Erreger in der nächsten Umgebung der Meerschweinchen.

Nachdem wir uns mehrfach davon überzeugt hatten, daß von erkrankten Kaninchen und Meerschweinchen im Bindehaut- und Nasen-

*) Literatur bei *Uchida*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **106**, III. Mittlg.

sekret, wie auch im Stuhlgang zahlreiche Erreger (Pneumokokken, Hühnercholera- und Paratyphus-B-Bakterien) ausgeschieden werden, untersuchten wir den Inhalt der Käfige, im besonderen die den Tieren zum Futter dienenden Rüben auf Vorhandensein der Erreger. Wir konnten in 10 derartigen Versuchen 6 mal im Heu bzw. auf den Rüben der Käfige erkrankter bzw. verendeter Tiere die Erreger der jeweils in Frage kommenden Seuchen nachweisen. Zur Luftuntersuchung im Stall aufgestellte Blutplatten zeigten in 4 Versuchen die Anwesenheit von Pneumokokken und Pasteurellabakterien in der Luft an. Es fanden sich in jedem Versuch auf mindestens einer der aufgestellten Platten einer der beiden Erreger, allerdings nur in 1—4 Kolonien. Die kulturelle Prüfung von solchen Stämmen ergab keine Unterschiede gegenüber den aus Seuchenfällen gewonnenen Erregern. Die Virulenz entsprach diesen Stämmen gleichfalls. Z. B. ergab die ip. Verimpfung von 4 verschiedenen aus der Luft gewonnenen Stämmen von Pasteurellabakterien auf Meerschweinchen tödliche Wirkung noch in $^{1}/_{100\,000}$ ccm der Reinkultur. Die Luftpneumokokken töteten Meerschweinchen subcutan in einer Dosis von 0,5 ccm. Für das Vorkommen pathogener bipolarer Septicämieerreger in der Luft der Seuchenställe spricht auch folgende Beobachtung: Im Stall II wurden im Glasgefäß 6 Mäuse neben den verseuchten Käfigen aufgestellt. 2 von diesen starben an Pasteurella sepsis, aller Wahrscheinlichkeit nach infolge von Einatmung der Keime mit der Luft, da nach der Versuchsanordnung Kontaktinfektionen so gut wie ausgeschlossen waren.

f) Bemerkungen über den pathologisch-anatomischen Befund.

Es soll hier nur eine kurze Übersicht gegeben werden.

Unter den 185 bakteriologisch genauer untersuchten, an Seuchen verendeten Tieren zeigten 14 lediglich mehr oder weniger stark geschwollene Lymphdrüsen, sonst keinen anatomischen Befund. Entweder waren sämtliche Lymphdrüsen des Körpers beteiligt oder nur Gruppen, in letzterem Fall hauptsächlich Cervical- und Trachealdrüsen. Bakteriologisch handelte es sich um Pneumokokken- und Pasteurellasepsisfälle.

In der Mehrzahl aller übrigen Fälle, ausgenommen die Paratyphuserkrankungen, bestand eine Pneumonie, vorwiegend in Form bronchopneumonischer Herde, nur 27 mal in Form einer *lobären* Erkrankung. Die lobäre Pneumonie war 1 mal durch Paratyphus-B-Infektion, 12 mal durch Pneumokokken, 14 mal durch Pasteurellabakterien bedingt. Dabei waren meist die Vorderlappen der Lungen befallen, seltener einer der Hinterlappen.

Neben den Erscheinungen der Pneumonie standen Entzündungen der serösen Häute oft im Vordergrund des Krankheitsbildes (Pleura, Peritoneum, auch Perikard) und zwar waren die durch den Pneumokokkus bedingten Veränderungen denen bei Pasteurellose nicht selten so ähnlich, daß auf Grund des Sektionsbefundes

meist lediglich Vermutungen angestellt werden konnten über die bakterielle Ätiologie. Im allgemeinen gingen die Hühnercholerainfektionen mehr mit hämorrhagischen Exsudaten, Schleimhaut- und Serosablutungen einher.

Die Lungenveränderungen erlaubten gewöhnlich Rückschlüsse auf das Alter des Prozesses. Es fanden sich frische Anschoppungen, Pneumonien im Stadium der roten Hepatisation, über linsengroße, graugelbe, oft sehr derbe, Konglomerattuberkeln ähnliche Herde, ausgedehnte Vereiterungen und Gangrän der Lungen, Schrumpfungen und mehr oder weniger derbe Pleuraadhäsionen.

Die Milz war bei der Pasteurellose gewöhnlich nicht oder nur unerheblich geschwollen, bei den Pneumokokkeninfektionen häufiger, bei Paratyphussepsis meist in hohem Grade.

In einem kleinen Teil — offenbar sind es chronisch verlaufende Erkrankungen — bestand das Bild der Pseudotuberkulose. Lungen, Milz, Leber und besonders Mesenterium wiesen dann linsen- bis haselnußgroße Knoten auf, mit sehr derber Bindegewebskapsel und zentraler Vereiterung oder Nekrose. Als Erreger fanden sich Paratyphusbakterien und bipolare Stäbchen der Pasteurellagruppe.

Aus den Sektionsbefunden eine Vorstellung zu gewinnen über die von den Erregern gewählte *Eingangspforte*, ist nicht ganz leicht. Wie neuerdings *Uchida* mit experimenteller Pasteurellainfektion auf den natürlichen Wegen zeigen konnte, ist es möglich, nach der jeweiligen Eintrittspforte *gewisse Typen des pathologisch-anatomischen Bildes* aufzustellen. Die Abgrenzung solcher Typen ist deswegen aber schwierig, weil auch auf hämatogenem metastatischem Wege bestimmte als Eingangspforten in Betracht kommende Organe offenbar in elektiver Weise erkranken können. Z. B. beobachtete *Uchida* hochgradige Pneumonien nach Infektion von der Haut aus. Nach *Uchidas* Beobachtungen entsprach einer erfolgreichen Inhalationsinfektion mit dem Bac. bipolaris in der Regel eine hervorstechende Erkrankung der Lungen und tiefen Cervicaldrüsen, einer erfolgreichen Fütterungsinfektion Schwellung der Cervical- und Mesenterialdrüsen und schwere Enteritis, der Infektion durch die unverletzte Haut eine Phlegmone des Unterhautzellgewebes.

Wenn wir die Befunde bei unseren Tieren mit aller Vorsicht nach diesen Gesichtspunkten ordnen, so finden wir bei der überwiegenden Mehrzahl unserer Pasteurella- und Pneumokokkenfälle (über $^2/_3$) den ersten Typus (hervorstechende Erkrankung der Respirationsorgane), bei den Paratyphusfällen war nur einmal unter 7 Fällen dieser Typus nachweisbar, in allen anderen handelte es sich um eine stärkere Erkrankung des Darmkanals und seiner Lymphdrüsen bzw. um Abscesse in Milz und Leber (3 mal). Diese fand sich auch hier und da bei Pneumokokken und Pasteurellainfektionen, und zwar teils isoliert, teils mit einer stärkeren Erkrankung des Respirationstraktus verbunden. 4 mal sahen wir bei trächtigen Tieren die Infektion von der Uterusschleimhaut ausgehen, welche stark aufgelockert und an mehreren Stellen geschwürig zerfallen war (1 Fall Pneumokokken, 3 Fälle Bac. bipolaris). Zweimal beobachteten wir eine hämorrhagische Septicämie im Anschluß an eine schwere Phlegmone des Unterhautzellen-

gewebes im Gebiet des Halses. Hier ist vielleicht die Infektion durch Bißverletzung entstanden.

Aus den Sektionsbefunden glauben wir schließen zu dürfen, daß *die Invasion der Pneumokokken und Hühnercholerabakterien hauptsächlich von den Lungen*, offenbar mehrfach auch vom Nasenrachenraum, seltener vom Darmkanal aus vor sich gegangen ist, während umgekehrt die *Paratyphusbakterien anscheinend in der Hauptsache den Darm als Eintrittspforte* gewählt haben.

Für die Annahme, daß die Lungen als Eintrittspforte von besonderer Wichtigkeit sind, spricht ja auch das Ergebnis unserer Lymphdrüsenuntersuchungen bei anscheinend gesunden bzw. lediglich mit einem Schnupfen behafteten Tieren. Die positiven Resultate betrafen ausschließlich die Trachealdrüsen.

III. Die Ursachen für Entstehung und Verlauf der Seuchen.

a) *Die Kaninchenseuche.*

Für die Entstehung der Seuche ist wichtig, daß unter den Zuchten der beiden Händler, von denen die von der Seuche befallenen Kaninchen stammten, wie unsere Nachforschungen ergeben haben, in den letzten Wochen Fälle von Kaninchenseuchen augenscheinlich nicht vorgekommen sind. Die Boxen, in denen die Tiere im Institut untergebracht wurden, waren seit über $^1/_2$ Jahr nicht benutzt worden. In dem Stall II, in dem die Boxen lagen, hatten sich seit längerer Zeit auch Kaninchen befunden. Zur Zeit des Ausbruchs der Seuche befanden sich im Stall, in Käfigen, noch 8 Kaninchen. Diese wie auch unsere früher zu Versuchen benutzten Kaninchen waren in den letzten Monaten stets gesund gewesen. Wenn so Anhaltspunkte für eine Ansteckung der neu eingestellten, augenscheinlich in gesundem Zustand an das Institut gelieferten Kaninchen nicht gewonnen werden konnten, so sprechen andererseits eine Reihe von Momenten von vornherein *dagegen, daß für die Entstehung der Kaninchenseuche eine Ansteckung gesunder von kranken Tieren überhaupt von Belang gewesen ist.* Erstens erkrankte die Mehrzahl der Tiere unmittelbar nach ihrer Unterbringung schlagartig, die Todesfälle liegen wohl nur deshalb auseinander, weil der Verlauf der Erkrankung bei den verschiedenen Individuen ein verschiedener ist. Zweitens erkrankten Kaninchen jedes der beiden Händler gleichzeitig. Drittens wiesen unsere Keimträgeruntersuchungen und die Beobachtungen von *Webster* daraufhin, daß in manchen Beständen beinahe 100% aller Kaninchen verschiedener Rassen auf ihren Schleimhäuten Bacillen der hämorrhagischen Septicämie beherbergen. Zur Erklärung der Entstehung eines Seuchenfalles bedarf es also gar nicht der Annahme einer Ansteckung von außen. Auch die so oft in wissenschaftlichen Instituten beobachteten sporadischen Fälle von Kaninchensepticämie,

z. B. im Verlauf von Tuberkuloseversuchen sind ja kaum anders zu erklären als durch Infektion der Tiere seitens pathogener Keime, die ihre eigenen Schleimhäute dauernd bewohnen.

Endlich muß noch auf die höchst mangelhafte Virulenz der Seuchenerreger gegenüber gesunden Kaninchen *bei natürlicher Infektion im Experiment* hingewiesen werden.

Was für die Entstehung der Seuche gesagt ist, gilt ohne weiteres auch für die Ausbreitung. Wenn Tiere an den Bewohnern ihrer eigenen Schleimhäute erkranken können, ist auch für die Erklärung jedes weiteren Seuchenfalles im Verlauf der Epidemie die Annahme echter Ansteckung von außen nicht erforderlich. Diese Bedingungen gelten aber nicht etwa ohne weiteres auch für andere Infektionen, z. B. nicht für den Mäusetyphus.

Es muß nun noch begründet werden, warum die bisher harmlosen Schleimhautbewohner mit einemmal in den Körper des Wirtsorganismus eindringen und eine Erkrankung hervorrufen.

Wir haben bereits in der Einleitung darauf hingewiesen, daß eine Reihe von äußeren Einflüssen imstande ist, die Widerstandsfähigkeit des tierischen Organismus gegen mancherlei Infektionen herabzusetzen. Eine derartige, die Resistenz des Kaninchen schwächende Schädigung glauben wir nun für unsere Kaninchenseuche nachweisen zu können.

Nach den außergewöhnlich warmen Monaten Dezember 1924 und Januar 1925 setzte Anfang März, und zwar genau zu dem Zeitpunkt, zu welchem die Kaninchen an das Institut geliefert und in den beiden Boxen des Stalles II untergebracht wurden, plötzlich Kälte ein.

Die mittleren Tagestemperaturen betrugen nach den Aufzeichnungen der öffentlichen Wetterdienststelle Berlin am 9. III. noch +2,7°, am 10. III. +0,4°; am 11. III., dem Tage der Einlieferung der Tiere —1,0°; am 12. III. sank die mittlere Tagestemperatur sogar auf —5,0° (Minimaltemperatur —7,2°); am 13. III. betrug sie —3,2° (Minimaltemperatur —6,8°); am 14. III. —0,1°. Wärmer wurde die Witterung erst wieder gegen den 18. III., die Nächte blieben aber noch längere Zeit nach diesem Termin kalt.

Diese Witterung mußte auf die in den Boxen untergebrachten Kaninchen deshalb besonders schädlich wirken, weil der Stall II, wie schon bemerkt, schlecht zu heizen war, und die Boxen selbst Zementfußboden hatten, der in nicht ausreichender Menge mit Stroh bedeckt war. Es kam also zu den Schwankungen der Lufttemperatur im Stall noch der Wärmeverlust hinzu, dem die Tiere seitens des kalten Bodens ausgesetzt waren.

Die Massenerkrankung unter den Kaninchen *unmittelbar im Anschluß an die Kälteschädigung* sprechen neben den oben erwähnten Momenten dafür, *daß die „Erkältung“ für Entstehung und Verlauf der Kaninchenseuche von entscheidender Bedeutung gewesen ist.*

b) Die Meerschweinchenseuchen.

Auch hier begegnet der Versuch, Entstehung und Verlauf der Seuchen allein durch Verbreitung und Wirkungsweise der Erreger zu erklären, unlösbaren Schwierigkeiten. Wie für die Erreger der hämorrhagischen Septicämie und für Kaninchen, müssen wir auch für Pneumokokken, Paratyphus-B- und Pasteurellabakterien annehmen, daß sie unter Meerschweinchen weitverbreitet sind. Was zunächst die Paratyphusbakterien betrifft, so wird ja bekanntlich eine sehr weite Verbreitung dieser Keime im Darm der verschiedensten Tierarten und auch in der Außenwelt allgemein angenommen. *B. Thomas* hat neuerdings darauf hingewiesen, daß ein Gleiches offenbar für Meerschweinchen zutrifft.

Für eine weite Verbreitung der *Pneumokokken* spricht schon das häufige Auftreten sporadischer Fälle von Pneumokokkensepsis bei Meerschweinchen ganz verschiedener Zuchten und ohne nachweisbaren Zusammenhang dieser Fälle mit vorausgehenden Erkrankungen. Unsere Keimträgeruntersuchungen sprechen im gleichen Sinne. Wenn häufig bei gesunden Meerschweinchen Pneumokokken an den Schleimhäuten nicht nachgewiesen werden konnten, so liegt das vielleicht daran, daß sie hier nur in kleinsten Mengen evtl. noch in Schleimhautnischen oder Drüsengängen verborgen leben und deshalb einer so groben Untersuchungsmethode, wie sie besonders nach unseren Erfahrungen an Kaninchen die Untersuchung des Nasenschleims darstellt, nicht zugänglich sind. Möglicherweise sind die Pneumokokken aber auch in der Hauptsache auf Meerschweinchen beschränkt, deren Schleimhäute leicht erkrankt sind und die deswegen den Keimen besonders günstige Lebensbedingungen bieten. Von solchen, z. B. mit Schnupfen behafteten Tieren, wie sie unter Meerschweinchenbeständen ziemlich häufig sind, kann dann von Zeit zu Zeit eine Ausstreuung der Keime stattfinden.

Die weite Verbreitung von Paratyphusbakterien und Pneumokokken unter den Meerschweinchen und die sehr geringe Virulenz, welche diese Erreger gegenüber gesunden Meerschweinchen bei experimenteller natürlicher Infektion aufweisen, spricht eindringlich dafür, daß die Infektionen unserer Epidemien nicht lediglich durch die pathogene Wirkung der Erreger zustande gekommen sind, sondern daß dabei eine Herabsetzung der Widerstandsfähigkeit des Organismus durch irgendwelche Einflüsse entscheidend mitgewirkt haben muß.

Nun hat man ja auch für die Erreger der hämorrhagischen Septicämie eine sehr weite Verbreitung bei den verschiedensten Tieren und in der nächsten Umgebung derselben angenommen (vgl. die einschlägigen Abschnitte im Handbuch von *Hutyra* und *Marek*, I, S. 93ff., Literatur s. auch bei *Neufeld*). In wie großem Umfange offenbar Kaninchen als Virusträger anzusehen sind, ist schon hervorgehoben worden. Unter

Meerschweinchen scheinen aber für gewöhnlich die Keime nicht so stark verbreitet zu sein. Darauf deuten die verhältnismäßig seltenen sporadischen Fälle von Pasteurellose hin, ebenso unser höchst dürftiges Resultat bei Untersuchungen auf Keimträger $^1/_2$ Jahr nach Ende der Endemie (1 : 34). Wenn auch dieses schlechte Ergebnis nach unseren Erfahrungen am Kaninchen mit künstlicher Schleimhautreizung nur mit Vorsicht zu verwerten ist, so steht die Annahme einer nur geringen Verbreitung der bipolaren Stäbchen unter den Meerschweinchen doch auch mit unserer Beobachtung gut in Einklang, daß die Bakterien der hämorrhagischen Septicämie selbst auf katarrhalisch affizierten Schleimhäuten und in Lymphdrüsen oft in ihrer Virulenz und in ihrem kulturellen Verhalten stark geschädigt werden und deshalb wahrscheinlich in vielen Fällen schnell zugrunde gehen. Vielleicht gelingt aber auch der Nachweis deswegen nicht, weil diese geschädigten Keime auf unseren Nährböden nicht zur Entwicklung kommen.

In den Frühjahrsmonaten 1925 waren nun insofern ganz besondere Bedingungen vorhanden, als für die Meerschweinchen *zur Aufnahme hochvirulenter Septicämiebacillen reichlich Gelegenheit* gegeben war. Erstens wurden im März und in den nächsten Monaten mehrfach Experimente mit *künstlicher* Pasteurellose an Meerschweinchen angestellt, wobei stets hochvirulente Kulturen Verwendung fanden. In den Versuchen erkrankten eine verhältnismäßig große Zahl parenteral infizierter Tiere und verendeten teils nach wochenlanger Krankheit. Zweitens ging der Meerschweinchenseuche die Kaninchenseuche voraus, diese spielte sich allerdings nur im Stall II ab. Endlich konnten noch die spontanen Seuchenfälle im Beginn der Endemie zu einer Verstreuung hochvirulenter Erreger Veranlassung geben.

Mit diesen besonderen Bedingungen mag es zusammenhängen, daß bei der Stallseuche des Jahres 1925 die hämorrhagische Septicämie mit etwa $^3/_4$ aller Seuchenfälle einen so hohen Anstieg erreichte, während bei früheren derartigen Endemien stets die Pneumokokkensepsis vorherrschte.

Der ganz augenscheinlich virulentere Mikroorganismus der hämorrhagischen Septicämie hat hier über den saprophytären Schleimhautschmarotzer den Sieg davon getragen.

Es darf nun aber nicht angenommen werden, daß die Seuche etwa *ausschließlich durch die andauernde starke Ausbreitung hochvirulenter Septicämieerreger hervorgerufen* worden sei. Eine *Gelegenheit* zur Ansteckung mit hochvirulenten Erregern der hämorrhagischen Septicämie war für die Meerschweinchen des Instituts auch vor und nach der Epidemie zeitweilig gegeben. Z. B. sind im Jahre 1921 von *B. Lange* gelegentlich seiner Superinfektionsversuche zahlreiche Meerschweinchen künstlich mit hochvirulenten Pasteurellabakterien infiziert worden. Im

März und April 1926 beobachteten wir ferner viele sporadische Fälle von Kaninchensepticämie. In beiden Fällen hatte die starke Verstreuung hochvirulenter Keime eine Endemie unter den Meerschweinchen *nicht* zur Folge, trotzdem die gesunden Meerschweinchen mit den kranken Tieren in engster Nachbarschaft lebten.

Ferner haben die Untersuchungen von *Uchida* mit natürlicher Infektion von Meerschweinchen ergeben, daß *von den natürlichen Eingangspforten aus Pasteurellaerreger für Meerschweinchen eine auffallend schlechte Virulenz besitzen*, selbst Seuchenstämme, welche auf parenteralem Wege sicher noch in kleinsten Mengen töten.

Damit soll die *Möglichkeit* einer echten Ansteckung unter natürlichen Verhältnissen nicht etwa ganz geleugnet werden. Eine Ansteckung mit dem Erfolg der Erkrankung kann aber bei unserer Seuche mindestens keine wichtige Rolle gespielt haben.

Die oben näher ausgeführten Gründe zwingen uns, für Entstehung und Verlauf unserer Meerschweinchenstallseuchen eine besondere *zeitliche Disposition der Tiere zu Infektionen* der beschriebenen Art vorauszusetzen. Wir konnten nun bestimmte, die Resistenz der Tiere herabsetzende Schädigungen für die fragliche Zeit in der Tat nachweisen.

Bevor wir auf diese Schädigungen bestimmter Art näher eingehen, wollen wir kurz eine Reihe von Momenten besprechen, die daneben gewissermaßen als *Hilfsursachen* in Betracht kommen.

Es ist uns wie zahlreichen früheren Beobachtern aufgefallen, daß junge Tiere von 200—250 g Körpergewicht häufiger von der Seuche befallen wurden als ältere, auch trächtige Tiere fanden sich ziemlich häufig unter den Erkrankten. Wenn die Sterblichkeit so besonders groß war in Käfigen, in denen 6 Meerschweinchen oder auch mehr untergebracht waren, so liegt das wohl daran, daß in überfüllten Käfigen jüngere und schwächliche Tiere von den Käfiggenossen vielfach übel behandelt, im besonderen an der geregelten Nahrungsaufnahme gehindert werden, andererseits sind hier natürlich auch die Chancen größer, daß Weibchen trächtig werden und hierdurch an Widerstandsfähigkeit einbüßen. Ferner muß an die in mancher Beziehung *unzureichende Ernährung der Tiere während des Winters* in unserem Institut gedacht werden. Es erscheint uns im besonderen zweifelhaft, ob die neben Hafer und Heu den Meerschweinchen verabfolgten Runkelrüben ausreichend *Vitamine* enthalten. Endlich ist bekannt, daß die *experimentelle Behandlung* der Versuchstiere (verschiedenartige künstliche Infektionen) diese in ihrer Resistenz anderen Infektionen gegenüber herabsetzt. Alle diese Umstände, die ja auch zu anderen Zeiten bestanden haben, ohne immer zu ausgebreiteten Seuchen zu führen, können für sich Entstehung und Verlauf der Epidemie in befriedigender Weise nicht erklären.

Wir konnten nun nachweisen, daß in den in Betracht kommenden Monaten die Meerschweinchen *fortgesetzten Erkältungsschädigungen* ausgesetzt waren.

Der Gesundheitszustand der Meerschweinchen war im März trotz der herrschenden Kälte noch ein befriedigender. Zwar machte sich eine gewisse Zunahme von Erkrankungen an Pneumonie gegen Mitte des

Monats bemerkbar, eine beträchtliche Häufung von Seuchenfällen trat indessen doch erst Ende März bzw. Anfang April ein. Daß die einsetzende Kälte Anfang März zunächst nur ein geringes Ansteigen der Todesfälle zur Folge hatte, hängt offenbar damit zusammen, daß bis Ende März die Ställe gleichmäßig Tag und Nacht geheizt wurden.

Am 29. III., einem Sonntag, war mit Rücksicht auf die seit einigen Tagen herrschende wärmere Witterung nur vormittags geheizt worden. In der Nacht vom 29. zum 30. III. trat aber plötzlich wieder vorübergehend Frost auf. Wir dürfen wohl die erste hohe Zacke der Epidemiekurve am 1. IV. mit dieser mangelhaften Beheizung am Sonntag in Verbindung bringen. Vom 30. III. bis 3. IV. wurde wieder Tag und Nacht geheizt. Vom 4. bis 9. IV. war die Heizung auf die Abendstunden beschränkt, vom 10. bis 16. IV. wurde gar nicht geheizt. Als am 16. IV. nachts wieder niedrige Lufttemperaturen beobachtet wurden, wurde die Heizung wieder angestellt und bis zum 21. IV. Tag und Nacht durchgeheizt. In dieser Zeit wurden in beiden Ställen, besonders in der Nähe der Heizkörper, nachmittags vorübergehend sehr hohe Lufttemperaturen (z. B. 25°) gemessen. Die Differenz gegenüber der recht geringen Morgentemperatur, welche trotz der Beheizung manchmal 6—10° betrug, war also eine beträchtliche. Vom 22. bis 24. IV. wurde wieder nur abends geheizt, dann mit dem Heizen ganz aufgehört, trotzdem die Temperaturverhältnisse bis zum 5. V. keine wesentliche Änderung erfuhren. Warme Witterung stellte sich erst von Mitte Mai ab ein.

Während dieser Periode der unregelmäßigen Heizung waren die Tiere naturgemäß *starken Schwankungen der Lufttemperatur* ausgesetzt. Der Effekt der kalten Lufttemperatur wurde durch die besonders Ende April herrschende *hohe Luftfeuchtigkeit* und die bei der morgendlichen Stallreinigung durch Öffnen der Türen und Fenster verursachte *Zugluft* noch verstärkt. Gerade im Stall II wurde, um der Überheizung entgegenzuarbeiten, wie nachträglich festgestellt worden ist, seitens der Stallbedienung absichtlich öfter Zugluft herbeigeführt, indem die beiden großen, einander gegenüberliegenden Türen zu gleicher Zeit geöffnet wurden.

Mit dieser Periode der Störungen in der Wärmeregulierung *stand nun die Endemie im engsten Zusammenhang. Mit dem Beginn der Störungen beginnt die stärkere Zunahme der Todesfälle, die Endemie hört auf, als diese Unregelmäßigkeiten ihr Ende erreichen und eine gleichmäßig warme Witterung einsetzt,* sie hört auf, trotzdem noch Mitte Mai mehrfach neubeschaffte Meerschweinchen in den „verseuchten" Ställen untergebracht wurden.

Wegen der bereits erwähnten, manchmal recht verschiedenen Verlaufsform der Seuchen ist es nicht möglich, die Auswirkung *jeder einzelnen* der fortgesetzten Reihe von thermischen Schädigungen an dem

Verlauf der Epidemie zu verfolgen. Manchmal konnte allerdings ein unmittelbarer Zusammenhang gehäufter Erkrankungen mit einer bestimmten thermischen Störung nachgewiesen werden. Z. B. befand sich im Stall II ein Käfig mit 7 Meerschweinchen unmittelbar gegenüber dem Heizkörper, von diesem $1^1/_2$ m entfernt und zugleich in dem zwischen den beiden Türen verlaufenden Gang des Stalles. Am 18. und 19. IV. wurde festgestellt, daß nachmittags zwischen 2 und 4 Uhr der Stall überheizt war, die Lufttemperatur in dem genannten Käfig betrug am 18. IV. 24°, am 19. IV. 25°. Sowohl am 19. wie am 20. IV. frühmorgens betrug die Lufttemperatur im Käfig nur 10° bzw. 8°. Als der Abteilungsleiter am 19. IV. morgens den Stall betrat, standen beide Türen weit offen und ein kalter Luftzug machte den Aufenthalt im Stall fast unerträglich. Von den 7 Tieren des genannten Käfigs *starben 5 am 21. IV.*, die beiden anderen einige Tage später. Der Sektionsbefund und die bakteriologische Untersuchung bei den 5 erstgenannten Tieren ergab frische Pneumonien und Pasteurellainfektion.

Die Frage, ob die geschilderten Erkältungen bei unseren Tieren nur bestimmte Organsysteme oder den gesamten Organismus geschädigt haben, ist nicht ohne weiteres in dem einen oder dem anderen Sinne zu beantworten. Zwar deutet die Tatsache, daß gelegentlich die verschiedensten Organsysteme vorzugsweise befallen sein können, darauf hin, daß die Neigung der einzelnen Organe zu erkranken individuell verschieden sein kann bzw. noch von anderen Momenten, z. B. der jeweiligen Ansiedlung der Erreger im Körper abhängt, im allgemeinen kann aber doch aus dem Beginn der Erkrankungen mit Schnupfen, dem so häufig im weiteren Verlauf beobachteten starken Ergriffenwerden der Lungen ebenso aus dem Nachweis isolierter Ansiedlung von Infektionserregern in den Trachealdrüsen (Keimträgeruntersuchungen an getöteten Meerschweinchen) *auf eine elektive Schädigung des Respirationstraktus* geschlossen werden. Bei der weiten Verbreitung von Paratyphusbacillen unter den Meerschweinchen ist es ja auch recht auffallend, wie wenige Paratyphuserkrankungen vorgekommen sind. Das erklärt sich wohl am ehesten aus der Annahme einer vorzugsweisen Ansiedlung der Paratyphusbacillen im Darm. Pneumokokken aber und die Bacillen der hämorrhagischen Septicämie haben offenbar ihren Hauptansiedlungsort auf den Schleimhäuten der oberen Luftwege, diese Bakterien sind es deshalb, welche entsprechend der vorzugsweisen Schädigung des Respirationstraktus hauptsächlich ihre verderbliche Wirkung entfaltet haben.

Zusammenfassung.

Im Frühjahr 1925 beobachteten wir eine Stallseuche unter Kaninchen und Meerschweinchen, der zahlreiche Tiere zum Opfer fielen. Als Erreger der Seuche wurden bei Kaninchen und Meerschweinchen Bacillen

der hämorrhagischen Septicämie nachgewiesen, bei den Meerschweinchen daneben noch Pneumokokken und in einzelnen Fällen Paratyphus-B-Bakterien.

Während auf den ersten Blick Entstehung und Verlauf dieser Seuche *lediglich von der Ausbreitung und den Wirkungen der verschiedenen Erreger abhängig* zu sein schien, führte die Untersuchung der näheren Bedingungen der Stallseuchen zu einem anderen Ergebnis.

Es zeigte sich nämlich, *daß die Seuchenerreger sowohl im Laboratoriumsexperiment* (Versuche, gesunde Kaninchen und Meerschweinchen von Haut, Lungen, Darmkanal und Bindehäuten zu infizieren) *wie auch unter natürlichen Bedingungen* (enges Zusammenleben gesunder Tiere mit kranken) *eine echte Infektion mit dem Erfolg der Erkrankung in der Regel bei gesunden Tieren gar nicht hervorrufen können.* Die Erreger sind sogar als harmlose Schleimhautbewohner unter Kaninchen und Meerschweinchen dauernd oder vorübergehend weit verbreitet, und zwar zum Teil in höchst virulenter Form.

Wenn sie trotzdem zu gewissen Zeiten, wie in unserem Falle, zu gehäuften Infektionskrankheiten seuchenhaften Charakters führen, so kann das nur darauf beruhen, *daß durch irgendwelche Einflüsse vorübergehend die Widerstandsfähigkeit der Tiere gegen Infektionen verschiedener Art herabgesetzt wird.*

Für unsere Tiere konnten wir nun solche Einflüsse nachweisen in Gestalt von *thermischen Schädigungen*, die während der fraglichen Monate fortgesetzt *Erkältungen* der Tiere veranlaßt haben. Ferner konnten wir experimentell zeigen, wie verhängnisvoll bereits eine kurzdauernde Schädigung der gesunden Schleimhäute für die geschädigten Tiere werden kann. Es gelang uns, durch Einträufelung einer 1 proz. Argentum-nitricum-Lösung und von Senföl in die Nasenhöhle bzw. den Bindehautsack bei 7 von 8 so behandelten, bis dahin gesunden Kaninchen ein Krankheitsbild zu erzeugen, das der leichten und der schweren Form der spontanen Kaninchensepticämie durchaus entsprach (Schnupfen und tödliche Sepsis).

Offenbar verfügt der gesunde Organismus, im besonderen die intakten Schleimhäute und Lymphdrüsen seiner natürlichen Eingangspforten, über *starke Abwehrkräfte.* Die Wirkung solcher Abwehrkräfte tritt neben der schon erwähnten Schwierigkeit, gesunde Tiere zu infizieren, z. B. auch darin zutage, daß, wie *Uchida* gezeigt hat, hochvirulente, von Meerschweinchen eingeatmete Bacillen der hämorrhagischen Septicämie in den Lungen *schnell abgetötet* werden, als Erfolg derartiger Abwehrkräfte sind auch die *Schädigungen des kulturellen Verhaltens, und im besonderen der Virulenz*, aufzufassen, die wir an einigen Pasteurellastämmen, die wir aus Nasensekret und den Trachealdrüsen gesunder Meerschweinchen züchteten, nachgewiesen haben.

Es handelt sich hier grundsätzlich um die gleichen Vorgänge, wie sie u. a. von *Killian*, *B. Lange* und seinen Mitarbeitern bei der natürlichen Infektion von Mäusen mit Streptokokken und anderen Bakterien beobachtet worden sind.

Erst wenn die natürlichen Abwehrkräfte des Körpers durch Schädigungen irgendeiner Art geschwächt sind, vermögen die hier in Frage kommenden Mikroorganismen im tierischen Organismus Fuß zu fassen, sich zu vermehren und von den Orten ihrer ersten Ansiedlung aus eine schwere septische Allgemeininfektion herbeizuführen.

Damit ist allerdings nur erklärt, warum überhaupt gehäufte Infektionen entstehen, *die Art der zustandekommenden Infektionskrankheit* ist natürlich durch die jeweilig auf den Schleimhäuten der Tiere befindlichen Mikroorganismen bedingt, wobei die *Virulenz* derselben eine wichtige Rolle spielt. Sind z. B. neben schwachvirulenten Pneumokokken bipolare Septicämieerreger hoher Virulenz vorhanden, so werden diese vermöge ihrer höheren Virulenz meist das Übergewicht gewinnen, oder es kommt, eine Beobachtung, die wir recht häufig machen konnten, zu einer *Mischinfektion*, an der beide Erreger beteiligt sind, wobei dahingestellt bleiben soll, inwieweit einer von den beiden für den anderen als Schrittmacher aufzufassen ist,

Auf die Analogien zwischen unseren Stallseuchen und bestimmten anderen endemisch oder epidemisch auftretenden Seuchen der Tiere und des Menschen ist von *B. Lange* hingewiesen worden, unsere Beobachtungen dürften insofern ein allgemein-epidemiologisches Interesse beanspruchen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Beck*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **15**, 359. 1893. — [2]) *Busson*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **86**, 101. 1921. — [3]) *Hutyra* und *Marek*, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. I. Jena 1922. — [4]) *Killian*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **102**, 262. 1924. — [5]) *Kraus, R.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **24**, 396. 1897. — [6]) *Neufeld*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 35, 957. — [7]) *Thomas, B.*, Journ. of infect. dis. **35**, Nr. 5, S. 407. 1924. — [8]) *Uchida*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **106**, 96, 275 u. 281. 1926.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Kiel. — Direktor: Professor *Korff-Petersen.*)

Der Stand der typhösen Erkrankungen (Typhus abdominalis und Paratyphus-B) in Schleswig-Holstein in den Jahren 1914—1924.

Zugleich ein Beitrag zur Bewertung der Typhusschutzimpfung.

Von

Dr. F. Weigmann,
Assistent am Institut.

Mit 2 Textabbildungen.

Die vorliegende Zusammenstellung soll einen Überblick geben über den Stand und die Verteilung der typhösen Erkrankungen in Schleswig-Holstein in den letzten 11 Jahren. Die Provinz Schleswig-Holstein bietet für epidemiologische Untersuchungen insofern besondere Bedingungen, als ihre durch die geographische Lage bedingte relative Abgeschlossenheit ein Übergreifen der Seuchen aus benachbarten Landesteilen erschwert, und der endemische Charakter der betreffenden Krankheiten deutlicher zu Tage tritt. Hinzu kommt, daß der Paratyphus B in dieser Provinz mehr als in den meisten anderen Gegenden Deutschlands vertreten ist, und daher reichliches Material für diese bakteriologisch wie epidemiologisch immer noch umstrittene Erkrankung zur Verfügung steht.

Zugleich soll aber auch versucht werden, auf Grund der Verteilung der typhösen Erkrankungen auf Alter und Geschlecht die Frage einer evtl. Nachwirkung der Typhusschutzimpfung einer näheren Betrachtung zu unterziehen.

Als Grundlage für die Zusammenstellung dienten die amtlichen Meldungen, die von den Kreisärzten dem Regierungspräsidenten zugestellt werden. Da dieselben wenigstens in der Form, in der sie dem Untersuchungsamt wieder zugehen, keine Angaben über Alter und Geschlecht enthalten, so mußten hierfür die bakteriologisch und serologisch festgestellten Fälle herangezogen werden. Es konnte daher für eine Zusammenstellung im letzteren Sinne nur ein Teil der Erkrankten berücksichtigt werden. Immerhin sind die Zahlen noch groß genug, um einen richtigen Einblick zu gewähren.

Unterleibstyphus.

In den Jahren 1914—24 wurden in Schleswig-Holstein 4692 Erkrankungen an Typhus abd. festgestellt. Das bedeutet bei einer Bevölkerungsziffer von rund 1 500 000 Einwohnern eine jährliche Typhushäufigkeit von 2,84 auf 10 000 Einwohner. Schleswig-Holstein hat somit im Vergleich zu andern Gegenden Deutschlands eine mittlere Typhusfrequenz. Im ganzen Reich betrug die Tpyhushäufigkeit im Jahre 1924 ca. 3,5, in Bayern, das wenig Typhus aufweist 1,0, bezogen auf den fast gleichen Zeitabschnitt von $11^1/_2$ Jahren sogar nur 0,58 [*Rimpau*[1])].

Im großen und ganzen macht sich die stetige Abnahme des Typhus abd., wie sie in den letzten Jahren vor dem Kriege für das ganze Reich festgestellt wurde, abgesehen von gewissen Schwankungen in einzelnen Jahren auch in Schleswig-Holstein weiterhin bemerkbar. Während *B. Fischer*[2]) für die Jahre 1899—1903 die jährliche Erkrankungsziffer auf 757 berechnet, eine Zahl, die einen bedeutenden Rückgang den vorhergehenden Jahren gegenüber darstellt, ergibt sich aus den Angaben *R. Müllers*[3]) für das Jahrzehnt von 1903—1913 eine jährliche Erkrankungsziffer von 463, für die vorliegenden 11 Jahre von 1914—24 eine solche von 426,5. Wenn diese Zahl keinen großen Rückgang dem vorherigen Jahrzehnt gegenüber darstellt, so liegt das daran, daß in den beiden letzten Kriegsjahren gehäufte Erkrankungen an Typhus auftraten, darunter im Jahre 1918 eine große Epidemie in Kiel und eine in Schusterkrug mit zusammen über 300 Erkrankungen. Deutlicher tritt die Abnahme des Typhus in den letzten fünf Jahren zu Tage.

	Zahl d. gem. Typhuserkrank.		Zahl d. gem. Typhuserkrank.
1920	459	1923	309
1921	375	1924	265
1922	330		

Um ein Bild der *örtlichen Verteilung* in der Provinz zu geben, wurde so verfahren, daß die jährliche Erkrankungsziffer der einzelnen *Kreise* auf 10 000 Einwohner errechnet wurde. Die Darstellung der örtlichen Verteilung soll ja zeigen, wo der Typhus in den Berichtsjahren sich eingenistet hatte. Daher war es notwendig, die Epidemien in Abzug zu bringen, denn sie würden einen Kreis, der sonst vielleicht sehr wenig von Typhus befallen ist, in dem sich aber in einem Jahr eine größere Epidemie ereignete, ungünstig belasten. Immerhin ist, um auch anderen Auffassungen gerecht zu werden, in der nachfolgenden Tabelle die Erkrankungsziffer mit Einschluß der Epidemien in Klammer verzeichnet worden. Es fallen nun in die Berichtsjahre nur die bereits genannten 2 Epidemien, so daß im ganzen das Bild nur wenig gestört wurde, und die Darstellung zwanglos die wirklichen Verhältnisse wiedergibt. Ferner

wurden die abgetretenen Gebiete (die Kreise Hadersleben, Apenrade und Nordtondern), die in der oben genannten Gesamtzahl noch mit berücksichtigt sind, für die aber seit 1920 keine Angaben mehr vorliegen, nicht mit einbezogen. Ordnet man nun die Kreise nach ihrer jährlichen Erkrankungsziffer auf 10 000 Einwohner, so ergibt sich folgende Reihenfolge:

Tabelle 1.

Nr.	Kreis	Ziffer	Nr.	Kreis	Ziffer
1.	Norderdithmarschen	3,9	13.	Lauenburg	1,8
2.	Südtondern	3,6	14.	Segeberg	1,6
3.	Kiel (Stadtkreis)	3,5 (4,8 m. Ep.)	15.	Bordesholm	1,6
4.	Oldenburg	3,4	16.	Flensburg (Stadtkreis)	1,5
5.	Süderdithmarschen	3,3	17.	Schleswig	1,5
6.	Eiderstedt	3,2	18.	Rendsburg	1,3
7.	Stormarn	3,1	19.	Flensburg Land	1,1
8.	Husum	2,9	20.	Plön	1,1
9.	Eckernförde	2,6 (3,3 m. Ep.)	21.	Wandsbek (Stadtkreis)	1,0
10.	Altona (Stadtkreis)	2,4	22.	Neumünster (Stadtkreis)	1,0
11.	Steinburg	2,4	23.	Frstt. Lübeck	0,9
12.	Pinneberg	1,8			

Zunächst zeigt sich, daß die größeren Städte (Stadtkreise) durchaus nicht die höchsten Erkrankungsziffern aufweisen, wie das in früheren Jahren, wo die Städte die Hauptbrutstätten des Typhus darstellten, der Fall war. Von den beiden Großstädten Kiel und Altona, steht zwar Kiel immerhin noch an dritter Stelle, wird aber von zwei ausgesprochenen Landkreisen übertroffen. Altona steht erst an zehnter Stelle, und die drei andern Stadtkreise, Flensburg, Wandsbek und Neumünster gehören zu denjenigen Kreisen, die die niedrigste Erkrankungsziffer aufweisen.

Stellt man Stadt und Land, letzteres getrennt in die kleinen Städte und das flache Land, einander gegenüber, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 2.

	Einwohnerzahl	Zahl der Erkrankungen	Jährliche Erkrankungen	Jährl. Erkrankungsziffer auf 10000 Einwohner
Stadtkreise	560 346	1597	145,18	2,59
Kleine Landstädte	229 927	941	85,54	3,72
Flaches Land	716 065	1512	137,45	1,92

Am meisten befallen sind die kleinen Landstädte. Wir haben hier dieselbe Erscheinung, wie sie *Rimpau*[1]) in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung für Südbayern festgestellt hat. Die Typhusfrequenz hat sich also von den größeren Städten aufs Land, und zwar hauptsächlich auf die kleinen Landstädte verschoben, oder bei gleichbleibender Frequenz auf dem Lande ist der Typhus in den größeren Städten

infolge der durchgeführten Assanierung so zurückgegangen, daß das Land jetzt die Stadt übertrifft. Das dichtere Beisammenwohnen bei vielfach fehlender Assanierung wird wohl die hohe Typhusfrequenz der kleinen Landstädte gegenüber dem flachen Lande bedingen.

Bei Betrachtung der Tabelle 1 ergibt sich noch eine andere bemerkenswerte Tatsache.

Unter den am meisten befallenen Kreisen befinden sich die Kreise der Westküste. Norderdithmarschen und Südtondern stehen an der Spitze, ihnen folgen in geringem Abstande Süderdithmarschen, Eiderstedt, Husum. Diese Kreise sind auch in allen 11 Berichtsjahren ziemlich gleichmäßig befallen. Die Westküste ist aber ausgesprochener Marschboden, der teilweise sogar unter dem Meeresspiegel liegt, mit hohem Feuchtigkeitsgehalt, bzw. hohem Grundwasserstande. Die Kreise des höher gelegenen trockenen Mittelrückens und der hügeligen Ostküste sind mit wenigen Ausnahmen (Oldenburg, Eckernförde) sehr viel weniger von Typhus befallen, ja weisen teilweise (Fürstentum Lübeck, Flensburg Land, Plön, Rendsburg) die niedrigste Erkrankungsziffer auf. Bei den beiden Kreisen Oldenburg und Eckernförde wird die hohe Typhusfrequenz durch ein stärkeres Befallensein in einzelnen Jahren hervorgerufen, während sie in anderen Jahren eine außerordentlich niedrige Erkrankungsziffer aufweisen. Diese Beobachtung steht aber in Widerspruch mit den Anschauungen der Pettenkoferschen Lehre, wie sie *Wolter*[4]) neuerdings wieder verficht, daß nämlich ein hoher Feuchtigkeitsgehalt des Bodens bei Vorherrschen des Wechselfiebers durch Fehlen des Typhus gekennzeichnet sei, daß aber mit der Trockenlegung sumpfigen Bodens bzw. dem Sinken des Grundwasserspiegels die Malariafieber schwinden und an ihrer Stelle die typhösen Fieber auftreten. In Schleswig-Holstein ist aber gerade die feuchte Marschgegend von Typhus heimgesucht, die höher gelegenen trockeneren Gegenden des Mittelrückens und der Ostküste viel weniger befallen.

Bei der Verteilung des Typhus auf die *Altersklassen* entfallen von 1494 Erkrankungen, die in diesem Sinne verwertet werden konnten, 29,25% auf die Kinder bis zu 15 Jahren, 63,52% auf das Alter von 16—50 Jahre und 7,23% auf das Alter über 50 Jahre. Das sind Zahlen, die mit den Angaben aus anderen Gegenden Deutschlands ziemlich genau übereinstimmen. Die Beteiligung der Kinder ist etwas geringer, als sie im Gebiet der Typhusbekämpfung im Südwesten des Reiches war, wo sie 32% betrug.

Von wesentlicher Bedeutung ist die Verteilung des Typhus auf das *Geschlecht*. Während vor dem Kriege die Beteiligung der beiden Geschlechter am Typhus ziemlich gleich war, sogar ein mäßiges Überwiegen des männlichen Geschlechts nachgewiesen werden konnte, ist nach dem Kriege die Erkrankungsziffer der Frauen bedeutend höher.

Dies ist von verschiedenen Autoren festgestellt worden. Auch für Schleswig-Holstein trifft diese Beobachtung zu. Von 2105 Erkrankungen in den Berichtsjahren entfallen 883 = 42% auf das männliche, 1222 = 58% auf das weibliche Geschlecht. Für die Kriegsjahre ist diese Erscheinung ohne weiteres aus der Abwesenheit der wehrpflichtigen Männer zu erklären. Betrachtet man aber die Jahre 1920—24, so bleibt das Verhältnis das gleiche. Von 811 Erkrankungen in diesem Zeitabschnitt entfallen 344 = 42,4% auf das männliche, 467 = 57,6% auf das weibliche Geschlecht. Man könnte annehmen, daß sich die Kriegsverluste hierbei geltend machen. Doch ist der zahlmäßige Unterschied der beiden Geschlechter nach dem Kriege nicht so groß, wie man vielleicht erwarten sollte. Die Bevölkerungszahl der Provinz betrug 1919 710 879 männliche und 751 308 weibliche Personen, im Jahre 1925 753 223 männliche und 781 594 weibliche Personen. Die männliche Bevölkerung macht also rund 49% der Gesamtbevölkerung aus. Der Unterschied ist also nicht groß genug, um das starke Überwiegen der weiblichen Bevölkerung in der Typhuserkrankungsziffer zu erklären. Man hat daher diese Erscheinung mit der *Nachwirkung der Typhusschutzimpfung* zu erklären versucht.

Wenn die Typhusschutzimpfung der dienstpflichtigen Männer im Kriege sich jetzt noch in dieser Weise geltend macht, so muß der Unterschied der beiden Geschlechter in der Typhusmorbidität der Nachkriegsjahre gerade bei diesen Altersklassen zum Vorschein treten. Und das ist tatsächlich auch der Fall, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 3.

	Jahrgang 1924—1901		Jahrgang 1900—1870*)		Jahrgang vor 1870	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
1920	29	38	34	60	5	7
1921	39	24	21	39	3	5
1922	27	26	16	38	1	5
1923	35	29	18	38	4	4
1924	26	24	6	32	2	4
Summe	156	141	95	207	15	25

Während also die jüngeren Altersklassen, die nicht schutzgeimpft sind, eine fast gleichhohe Erkrankungsziffer aufweisen, sogar das männliche Geschlecht etwas stärker befallen ist, überwiegt in den Jahrgängen

*) Der Jahrgang 1900 umfaßt diejenigen, die im letzten Kriegsjahre als 18jährige noch dienstpflichtig wurden, der Jahrgang 1870 die bei Ausbruch des Krieges mit 45 Jahren noch eingezogenen Landsturmleute. Die jüngeren und älteren Altersklassen, die Jahrgänge 1924—1901 und vor 1870, müssen als nicht durchgeimpft gelten.

1900—1870 das weibliche Geschlecht um mehr als das Doppelte. In den älteren Jahrgängen ist zwar auch noch das weibliche Geschlecht mehr beteiligt, doch sind die Zahlen zu gering, um daraus bindende Schlüsse ziehen zu können. Vergleicht man damit die letzten Jahre vor dem Kriege, so ist dieser Unterschied nicht vorhanden, vielmehr ein geringes Übergewicht des männlichen Geschlechts nachzuweisen.

Tabelle 4.

	0—17 Jahre		18—45 Jahre		Über 45 Jahre	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
1910	11	8	23	22	4	0
1911	17	22	46	34	5	6
1912	17	9	38	30	1	7
1913	31	28	49	32	10	10
Summe	76	67	156	118	20	23

Ähnliche Angaben liegen von anderen Autoren vor. So findet *Hage*[5]) die gleiche Verteilung der Erkrankungsziffer auf Altersklassen und Geschlecht im Typhusbekämpfungsgebiet Mitteldeutschlands, *Scheven*[6]) in Meklenburg und *Abel*[7]) für die Typhussterblichkeit in Preußen. Die gleichen Beobachtungen werden aus Frankreich mitgeteilt (zitiert bei *Hage*). Sämtliche Autoren erklären diese Erscheinung mit einer Nachwirkung der Typhusschutzimpfung.

Nun finden wir aber dasselbe Überwiegen des weiblichen Geschlechtes in den genannten Altersklassen auch bei den Paratyphuserkrankungen. Von 997 Erkrankungen an Paratyphus B entfallen 369 = 37% auf das männliche und 628 = 63% auf das weibliche Geschlecht.

Betrachtet man nur die Nachkriegsjahre, so bleibt auch hier das Verhältnis das gleiche. Von 634 Erkrankungen weist das männliche Geschlecht 241 = 38%, das weibliche 393 = 62% auf. Verteilt auf die Altersklassen, soweit Angaben vorhanden, ergibt sich folgendes Bild.

Tabelle 5.

	Jahrgang 1924—1901		Jahrgang 1900—1870		Jahrgang vor 1870	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
1920	17	20	13	21	1	0
1921	31	35	24	37	0	1
1922	16	23	6	14	1	1
1923	22	25	7	19	1	0
1924	35	51	13	47	2	3
Summe	121	154	63	138	5	5
		bzw.	43	95 (ohne Epidemien)		

Und für die Vorkriegsjahre:

Tabelle 6.

	0—17 Jahre		18—45 Jahre		Über 45 Jahre	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
1910	8	5	5	12	2	4
1911	9	5	9	4	1	0
1912	4	5	9	6	0	1
1913	8	1	8	7	1	1
Summe	29	16	31	29	4	6

Zwar liegen die Verhältnisse beim Paratyphus B etwas komplizierter. In die Jahre 1921 und 1924 fallen einige Epidemien, die durch Milch hervorgerufen waren, und es ist eine bekannte Tatsache, daß bei Milchepidemien vorzugsweise Frauen und Kinder erkranken. Aber auch nach Abzug dieser Epidemien bleibt immer noch in den Jahrgängen 1900—1870 eine Mehrbeteiligung des weiblichen Geschlechtes um über das Doppelte bestehen. Gegen Paratyphus hat aber keine allgemeine Schutzimpfung im Kriege stattgefunden. *Das Überwiegen des weiblichen Geschlechtes scheint demnach nicht auf einer Nachwirkung der Typhusschutzimpfung zu beruhen, und die Annahme einer solchen scheint unrichtig zu sein.*

Wenn *Friedberger*[8]) in seiner Arbeit „zur Frage der Typhus- und Choleraschutzimpfung" die Ansicht ausspricht, daß man erst einige Jahre nach dem Kriege aus dem evtl. Überwiegen des weiblichen Geschlechtes in der Typhusmorbidität ein Urteil über den Wert der Schutzimpfung gewinnen könnte, so ist das erwartete Ergebnis zwar eingetroffen, die ihm zugesprochene Bedeutung aber in Frage gestellt. Die obigen Ausführungen scheinen demnach geeignet zu sein, die herbe Kritik *Friedbergers* u. a. an der Bewertung der Schutzimpfung zu unterstützen. Wir wissen jedoch nichts Sicheres über die Dauer der durch die Schutzimpfung erzeugten Immunität. Die allgemeine Ansicht geht doch wohl dahin, daß der Schutz nur 6 Monate besteht, was ja praktisch darin zum Ausdruck kommt, daß die Impfung nach dieser Zeit wiederholt wurde.

Die oben geschilderte Erscheinung braucht also nicht gegen den Wert der Typhusschutzimpfung zu sprechen*).

*) In einer kürzlich erschienenen Arbeit ist nun nicht nur der Wert der Typhusschutzimpfung bezweifelt, sondern sogar ihre Schädlichkeit im Sinne einer gesteigerten Empfänglichkeit behauptet worden [*Spät*[9])]. Wenn diese Frage auch nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem uns hier beschäftigenden Thema steht, so möchte ich doch mit ein paar Worten darauf eingehen. Die vom Verf. angeführten Zahlen und Tabellen sprechen m. E. ebensowenig für eine Schädlichkeit der Schutzimpfung, wie nach Ansicht *Friedbergers* die Angaben *Hünermanns*

Es dürfte jedoch schwer sein, eine Erklärung dafür zu geben. Der Bedeutung der Kriegsverluste wurde oben schon gedacht. Selbst wenn man berücksichtigt, daß die geringe Differenz zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht in ihrem zahlenmäßigen Anteil an der Gesamtbevölkerung vorwiegend auf die Jahrgänge 1870—1900 entfallen wird, so daß hier ein größerer Unterschied zutage treten würde — man hat angenommen, daß in den Altersklassen 18—45 auf 5 Männer 6 Frauen kommen —, so reicht das doch nicht hin, um das gewaltige Überwiegen des weiblichen Geschlechtes um mehr als das Doppelte in der Typhus- und Paratyphuserkrankungsziffer in diesen Jahrgängen zu erklären.

Wenn man sich auf den Standpunkt *Friedbergers* stellen will, so könnte man die Durchseuchung der Heeresangehörigen und die dadurch bedingte natürliche Auslese und Selbstimmunisierung, der *Friedberger* ja einen wesentlichen Einfluß auf die Abnahme der Typhuserkrankungen im Felde zuerkennen will, auch für die Erscheinungen der Nachkriegszeit als Erklärung heranziehen. Die im Verlaufe des Krieges erfolgte starke Zunahme des Paratyphus, die im Jahre 1917 nach den Angaben *Hübeners*[10]) eine Höhe erreichte, daß man den Eindruck ge-

für einen Nutzen. Zunächst scheint es allerdings so, als ob in den ersten 3 Monaten nach der Impfung, wie der Verf. zu beweisen sich bemüht, die Empfänglichkeit gesteigert ist. Aus den auf S. 224 angeführten Zahlen geht das noch nicht so deutlich hervor. Die hohe Zahl im 1. Monat kann durch eine Impfung im Inkubationsstadium bedingt sein, und daß dieselbe dann einen beschleunigten Ausbruch der Krankheit herbeiführt, wird auch von den Anhängern der Schutzimpfung nicht geleugnet. Im 2. und 3. Monat ist die Zahl doch schon bedeutend geringer. Anders in der auf S. 226 angeführten Tabelle *Hünermanns*. Hier sind die Erkrankungen allerdings im 1., 2. und 3. Monat fast gleich hoch. Verf. übersieht aber anscheinend, daß die Mortalitätsziffer bedeutend, um das $2^1/_2$—4fache geringer ist als bei den Ungeimpften, ganz abgesehen davon, daß es sich um das Sanitätspersonal eines Seuchenlazaretts handelt, das der Infektionsgefahr besonders ausgesetzt ist (*Friedberger*, der dieselbe Kurve kritisiert, gibt das Sinken der Mortalitätsziffer zu, glaubt ihr aber deswegen keine Bedeutung beimessen zu sollen, weil „6 Monate nach der Impfung, wo der Schutz nach den vorliegenden Erfahrungen schon annähernd erloschen sein mußte, die Sterblichkeit weiter bis auf 0% gesunken ist.“ Nach 6 Monaten ist die Sterblichkeit allerdings = 0, vom 7. Monat an schnellt sie aber, wie dieselbe Kurve zeigt, auf 7,5—11,9% in die Höhe. Das würde dafür sprechen, daß der Impfschutz gerade 6 Monate dauert). Bei den auf S. 227 angeführten Kurven berücksichtigt der Verf. offenbar nicht, daß der Anstieg und Gipfel der Kurven im August liegt, d. h. mit dem natürlichen Höhepunkt des Typhus zusammenfällt, und daher von der vorher stattgefundenen Schutzimpfung nicht abhängig zu sein braucht. Unsere unten dargestellte Kurve der Acme des Typhus zeigt dieselbe Steigerung, ja selbst den doppelten Gipfel im August und Oktober auf Kurve 3 des Verf. finden wir in unserer Darstellung für die Jahre 1920—1924 wieder. Im übrigen beginnt in der genannten Kurve 3 der Anstieg erst im 5. Monat nach der Schutzimpfung und nicht im 1. bis 3. Monat. Damit scheint mir aber das vorgebrachte Material der Beweiskraft für die Schädlichkeit der Typhusschutzimpfung zu entbehren.

wann, als ob der Paratyphus den Typhus verdrängt hätte, könnte dann auch für den Paratyphus dieselben Bedingungen geschaffen haben. Von einer Durchseuchung des deutschen Heeres kann man meines Erachtens aber, abgesehen von einzelnen Truppenkörpern, nicht sprechen, dazu sind die Zahlen der Typhus- und Paratyphusmorbidität von wenigen Promille zur Zeit der Höchstmorbidität zu gering.

Auch die Annahme einer besonderen Geschlechtsdisposition, die *Peller*[11]) für verschiedene Infektionskrankheiten und auch für den Unterleibstyphus im Sinne einer erhöhten Empfänglichkeit des weiblichen Geschlechtes vertritt, dürfte nicht in Frage kommen. Ganz abgesehen davon, daß seine Angaben im Widerspruch mit dem in Deutschland und auch anderswo erhobenen statistischen Material stehen, spricht das verschiedene Verhalten der beiden Geschlechter in der Vor- und Nachkriegszeit und die Beschränkung des Unterschiedes auf bestimmte Altersklassen gegen eine solche Annahme.

Es käme noch in Frage, eine Ausdehnung des Typhusimpfschutzes auch auf den Paratyphus anzunehmen. Dagegen sprechen die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen (*Neufeld* und *Hüne*[12]), *Kutscher* und *Meinicke*[13]), zitiert bei *Hübener*, Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen, S. 86 ff). Zwar will *Baumgärtel*[14]) unter dem Einfluß der Typhuschutzimpfung eine Herabsetzung der Züchtbarkeit bzw. Verzögerung des Nachweises der Paratyphusbakterien aus dem Blute festgestellt haben. Außer vielen Einwendungen, die man gegen das von ihm vorgebrachte Material erheben kann, besagt das aber noch nichts für eine etwa bestehende Schutzwirkung. Von größerer Bedeutung sind in dieser Hinsicht schon die Angaben von *Herz*[15]). Dieser Autor berichtet von vier Fällen, welche zu verschiedenen Zeiten zwei bakteriologisch differente typhöse Infektionen durchgemacht haben. Das Überstehen der ersten Erkrankung, z. B. Typhus, hatte einen außerordentlich milden und kurzen Verlauf der zweiten Erkrankung, z. B. Paratyphus B und umgekehrt, zur Folge. Außerdem konnte Verf. eine Kategorie von Kranken feststellen, „bei denen nach abgelaufenem Typhus oder Paratyphus sicherlich eine zweite Infektion — Aufnahme einer zweiten Art von Bacillen (Typhus oder Paratyphus) ins Blut — stattgefunden hat, welche, abgesehen von leichter Temperatursteigerung in zwei Fällen, zu keinerlei Krankheitserscheinungen führt, welche sich aber durch Ausscheidung der betreffenden Keime durch den Harn und Veränderung des Harnsediments kenntlich macht“. In letzterem Falle könnte man allerdings an Mischinfektionen denken, zumal es sich um Soldaten vom südwestlichen Kriegsschauplatz handelt, die einer doppelten Infektion leichter ausgesetzt waren, wenn es auch auffällt, daß die Ausscheidung der zweiten Bakterienart immer erst 3—5 Wochen nach Beendigung der ersten Erkrankung erfolgte. Immerhin

sind diese Angaben beachtenswert. Da in den angeführten Fällen das Serum des Rekonvaleszenten keine Bakterolysine gegen die zweite Bakterienart enthielt, so nimmt Verf. eine durch die erste überstandene Erkrankung hervorgerufene Gewebsimmunität als Erklärung an. Man könnte sich nun vorstellen, daß auch die Typhusschutzimpfung eine unspezifische Veränderung des Gewebes im Sinne einer erhöhten Abwehrbereitschaft hervorruft und so auf indirektem Wege eine Wirkung auch auf den Paratpyhus ausübt. Zunächst sind mir aber ähnliche Beobachtungen, wie sie *Herz* mitteilt, aus der Literatur nicht bekannt. Vor allem müßte sich aber eine solche Wechselwirkung schon während des Krieges gezeigt haben. Die dauernde Zunahme des Paratyphus nach der Typhus-Schutzimpfung bei gleichzeitiger Abnahme des Typhus spricht wohl am besten gegen diese Auffassung.

Die Ursache für das Überwiegen des weiblichen Geschlechts in der Typhus-Erkrankungsziffer bleibt also vorläufig noch ungeklärt. Daß es sich um Auswirkungen des Krieges handelt, ist anzunehmen, da der Unterschied nur bestimmte Altersklassen betrifft und vor dem Kriege nicht vorhanden war. Meines Erachtens wird die Frage nicht eher eine befriedigende Lösung finden, bis weiteres Material aus anderen Gegenden Deutschlands gesammelt ist und die Untersuchung nicht nur auf den Typhus, sondern auch auf den Paratyphus und andere Seuchen ausgedehnt wird. In der schon zitierten Zusammenstellung von *Rimpau*[1]) findet sich auch ein Überwiegen des weiblichen Geschlechtes beim Paratyphus. 194 weiblichen Erkrankungen stehen 155 männliche gegenüber. Eine Einteilung nach Altersklassen ist nicht gemacht. Ich möchte jedoch annehmen, daß der Unterschied sich auf die Jahrgänge 1900—1870 beschränkt. Wenn die Differenz nicht so groß ist wie bei unserem Material, so liegt das daran, daß *Rimpau* auch die Fleischvergiftungen mit hineinbezogen hat, bei denen nach unserer Auffassung ganz andere ätiologische und epidemiologische Momente als beim Typhus und Paratyphus in Betracht kommen. Bei unserer Zusammenstellung handelt es sich lediglich um den echten Paratyphus B, die typhöse Form.

In dem behandelten Zeitraum von 11 Jahren sind nur 2 Typhusepidemien aufgetreten, die eine in Kiel, die andere in Schusterkrug (Kreis Eckernförde), beide im Jahre 1918. In Kiel ereigneten sich von Juli bis Dezember allein 267 Typhuserkrankungen, davon 213 in der Zeit vom 14. Juli bis 21. September. Die Epidemie ist nicht aufgeklärt. In Verdacht kamen verschiedene Molkereien und Milchhandlungen, doch konnte ein Dauerausscheider nirgendwo aufgespürt werden. In Schusterkrug kamen in der zweiten Aprilwoche 31 Fälle zur Anzeige, denen sich bis Ende Mai noch 9 weitere anschlossen, so daß die Gesamtzahl der Fälle dieser Epidemie 40 betrug. Hier lenkte sich der Verdacht auf einen zentralgelegenen Brunnen, aus dem die Erkrankten nachweisbar

ihr Wasser bezogen, und dessen Lage und Zustand in hygienischer Beziehung alles zu wünschen übrig ließ. Nach Schließung des Brunnens erlosch die Epidemie schnell. Außer diesen beiden Epidemien sind nur gelegentlich kleine Gruppenerkrankungen von 10—15 Fällen aufgetreten, so auf dem Gute Schönhagen (Kreis Eckernförde) und dem ehemaligen Truppenübungsplatz und jetzigen Siedlungsgebiet Lockstedter Lager. Beide sind auf mangelnde hygienische Verhältnisse zurückzuführen.

Über die Acme des Typhus wird unten im Zusammenhang mit dem Paratyphus berichtet.

Paratyphus.

Paratyphus A kommt in Schleswig-Holstein nicht vor. Dagegen ist der Paratyphus B sehr verbreitet. In den Jahren 1914—24 sind 1134 Erkrankungen zu verzeichnen. Diese Summe stellt eine Mindestzahl dar, da in den ersten Jahren noch manche Paratyphus-B-Erkrankungen als Typhus gemeldet sind, was daraus hervorgeht, daß die Zahl der bakteriologisch oder serologisch festgestellten Fälle die der amtlich gemeldeten weit übertrifft. Später nähern sich die beiden Zahlenangaben allmählich einander. Im übrigen wird die Diagnose Paratyphus B, abgesehen von Epidemiezeiten, wohl meist erst auf Grund des bakteriologischen Befundes gestellt werden, so daß auch aus diesem Grunde die oben genannte Zahl das Mindestmaß an Erkrankungen darstellt.

Diese 1134 Erkrankungen bedeuten eine jährliche Paratyphusfrequenz von 0,69 auf 10 000 Einwohner. Als Vergleich steht mir nur aus den Angaben *Rimpaus* die Zahl für Südbayern zur Verfügung. Sie berechnet sich für fast den gleichen Zeitraum auf 0,26 für 10 000 Einwohner, wobei die Fleischvergiftungen noch mit einbezogen sind. Jedenfalls dürfte die genannte Zahl für Schleswig-Holstein eine recht hohe Paratyphusfrequenz darstellen und der nicht selten geäußerten Ansicht widersprechen, daß die Paratyphus-B-Erkrankungen in erster Linie in den südwestlichen Teilen Deutschlands vorkämen.

Über die jährliche Erkrankungsziffer der Kreise gibt folgende Tabelle Aufschluß.

Tabelle 7.

Nr.	Kreis	Ziffer	Nr.	Kreis	Ziffer
1.	Fürstentum Lübeck	2,39 (3,0 m.Ep.)	13.	Flensburg Land	0,4
2.	Südtondern	1,0	14.	Pinneberg	0,3
3.	Oldenburg	0,7	15.	Altona	0,3
4.	Husum	0,7	16.	Wandsbek	0,3
5.	Rendsburg	0,7	17.	Neumünster	0,2
6.	Kiel	0,6 (1,27 m.Ep.)	18.	Bordesholm	0,2
7.	Steinburg	0,5	19.	Schleswig	0,2
8.	Stormarn	0,4	20.	Norderdithmarschen	0,1
9.	Plön	0,4	21.	Segeberg	0,1
10.	Lauenburg	0,4	22.	Eckernförde	0,1
11.	Eiderstedt	0,4	23.	Süderdithmarschen	0,1
12.	Flensburg	0,4 (1,15 m.Ep.)			

Am meisten befallen ist das Fürstentum Lübeck mit 2,39 auf 10 000 Einwohner nach Abzug der Epidemien. Ihm folgt der Kreis Tondern mit 1,0 und andere Landkreise wie Oldenburg, Husum, Rendsburg. Die beiden Großstädte Kiel und Altona stehen erst an 6. bzw. 15. Stelle. Stellt man die Stadtkreise den Landkreisen gegenüber, so ergibt sich

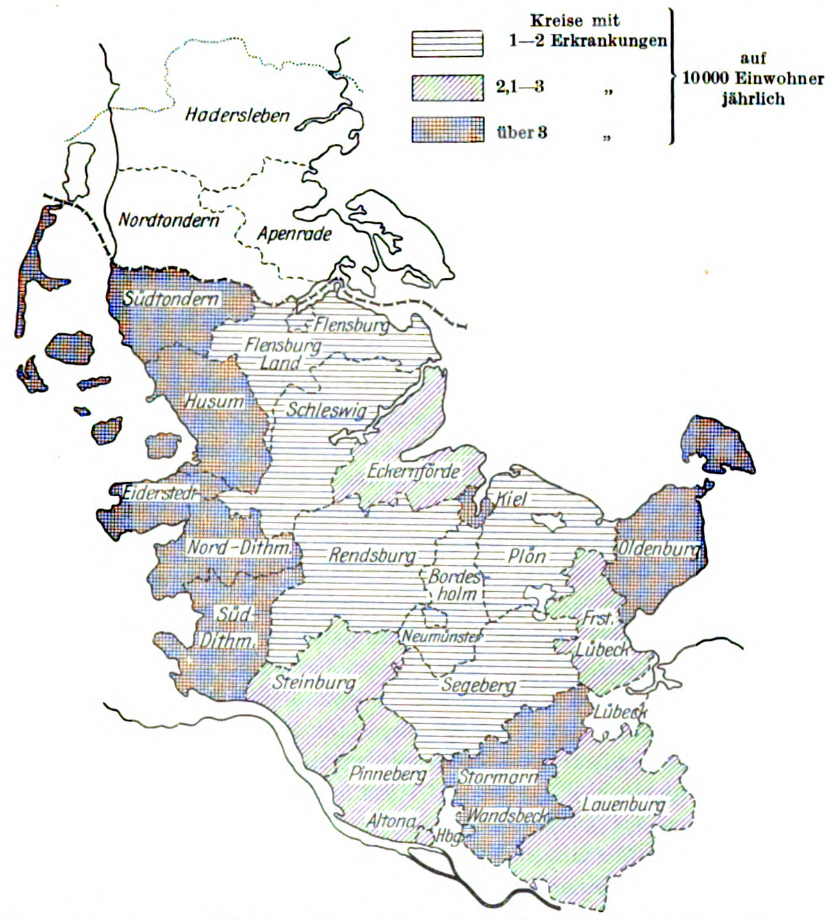


Abb. 1. Verteilung der typhösen Erkrankungen (Typhus abd. und Paratyphus B) in Schleswig-Holstein 1914—1924.

ein geringes Übergewicht der Landkreise mit 0,48 gegen 0,45. Also auch hier ein ähnliches Verhalten wie beim Typhus. Ein auffallender Unterschied im Befallensein der Ost- und Westküste ist, abgesehen vom Fürstentum Lübeck, nicht festzustellen. Die obengenannten am meisten befallenen Kreise liegen teils an der Ost-, teils an der Westküste. Im Fürstentum Lübeck aber bzw. der kleinen Stadt Eutin ist der

Paratyphus B seit einigen Jahren endemisch. Hier kommen jährlich mehr oder minder zahlreiche Erkrankungen vor, und sind in den letzten 4 Jahren 2 Epidemien zu verzeichnen. Wie gesagt, besteht dieses Befallensein erst seit einigen Jahren, früher war der Landesteil fast frei von Paratyphus, und was den Typhus anbetrifft, so weist er auch heute noch die geringste Erkrankungsziffer auf (s. Tabelle 1).

Fassen wir Typhus und Paratyphus B zusammen und tragen die Erkrankungsziffer der Kreise in eine Landkarte der Provinz ein, so ergibt sich folgendes Bild von der örtlichen Verteilung der typhösen Erkrankungen in Schleswig-Holstein während der Jahre 1914—24. (Abb. 1.)

Infolge der Kleinheit der Zahlen beim Paratyphus unterscheiden sich die Erkrankungsziffern nicht wesentlich von den in Tabelle 1 angegebenen. Nur das Fürstentum Lübeck nimmt wegen seiner hohen Paratyphusfrequenz eine andere Stellung in der Reihenfolge der Kreise ein.

Das bereits obenerörterte Bild tritt deutlich hervor. Die Kreise der Westküste, die vorwiegend aus Marschboden mit hohem Grundwasserstand bestehen, sind am meisten befallen. Durch die Mitte des Landes zieht in der Längsrichtung von Norden nach Süden der hohe, trockene und sandige Mittelrücken mit sehr gleichmäßigem, tieferem Grundwasserstande. Hier liegen die Kreise mit niedrigster Erkrankungsziffer. Im Osten und Süden — vorwiegend Grundmoränenlandschaft mit sehr wechselndem Grundwasserstand — ist das Bild mannigfaltiger, Kreise mit sehr hoher und sehr niedriger Erkrankungsziffer, z. B. Oldenburg und Plön, liegen nebeneinander. Man könnte aus dieser Verteilung vielleicht auf eine Abhängigkeit des Auftretens typhöser Erkrankungen von der Bodenbeschaffenheit schließen, sie zeigt aber, wie oben schon erwähnt wurde, ein Verhalten, das den Lehren der Anhänger *Pettenkofers* gerade entgegengesetzt ist.

Bei Verteilung auf die *Altersklassen* entfallen auf das kindliche Alter bis zu 15 Jahren 31,1%, auf das Alter von 16—50 Jahre 64,1% und über 50 Jahre 4,8%. Verglichen mit den Zahlen beim Typhus ist das kindliche Alter etwas mehr, das höhere weniger befallen.

Über die Verteilung auf das Geschlecht wurde schon beim Typhus gesprochen.

In dem Zeitraum von 1914—1924 ereigneten sich 5 *Epidemien*, 4 davon allein in den letzten Jahren von 1921—24. In das Jahr 1917 fällt eine größere Epidemie in Flensburg mit über 70 gemeldeten Erkrankungen, von denen 56 bakteriologisch oder serologisch festgestellt wurden. Aufgeklärt wurde die Ursache dieser Epidemie nicht. Im Jahre 1921 ereignete sich in Kiel eine kleine Epidemie von etwa 20 Erkrankungen und eine größere in Eutin von Mitte Juni bis Ende August mit 44 bakteriologisch oder serologisch festgestellten Fällen.

Von diesen wurden nur 27 amtlich gemeldet, nach Angabe der Ärzte soll die Zahl der Erkrankten jedoch etwa 100 betragen haben. In das Jahr 1924 fällt dann wieder eine große Epidemie in Kiel-Gaarden mit rund 120 Erkrankungen und eine Massenerkrankung in Eutin im dortigen Ursulinenkloster mit 14 Fällen.

3 Epidemien, und zwar die beiden des Jahres 1921 und die Kiel-Gaardener 1924, sind durch infizierte Milch hervorgerufen worden. Die Quelle konnte jedesmal in Gestalt eines weiblichen Dauerausscheiders festgestellt werden; bei der Kiel-Gaardener Epidemie allerdings nur mit Wahrscheinlichkeit, insofern, als nur ein positiver Widal, kein positiver Bacillenbefund erbracht werden konnte. Besonders interessant ist die Eutiner Epidemie 1921, bei der sich die ersten explosionsartig auftretenden Erkrankungen genau um den Weg gruppierten, den der Milchwagen eines Gehöftes jeden Tag zu machen pflegte. Die Epidemie ist in einer besonderen Arbeit bereits früher veröffentlicht worden [*Havemann*[16])]. Allen 3 Epidemien war die für Milchepidemien typische Erscheinung eigen, daß beim ersten Auftreten fast nur Frauen und Kinder erkrankten. Erst im weiteren Verlauf, gewöhnlich nach einer kleinen Pause, traten auch Erkrankungen der männlichen Erwachsenen auf. Diese sind wohl als Kontaktinfektionen zu werten.

Etwas anders lagen die Verhältnisse bei der kleinen Eutiner Epidemie, im Ursulinenkloster, die im Spätherbst 1924 einige Monate nach der Kiel-Gaardener auftrat. Als Infektionsquelle konnte ein Dienstmädchen festgestellt werden, das im Sommer noch in Kiel-Gaarden gewohnt, sich dort bei der großen Epidemie infiziert hatte und zur Dauerausscheiderin geworden war. Dieses Mädchen war im Gemüsegarten und in der Küche mit der Zubereitung von Speisen beschäftigt. Die Folge davon war, daß plötzlich eine größere Anzahl von Schülerinnen des Klosters, die dort wohnten und beköstigt wurden, erkrankten. Bei den wiederholten bakteriologischen Durchuntersuchungen konnte dann ferner festgestellt werden, daß die Oberin des Klosters im Verlauf der Epidemie, ohne selbst zu erkranken, zur Bacillenträgerin wurde.

Es mag noch darauf hingewiesen werden, daß die Dauerausscheider der 4 Epidemien sämtlich weiblichen Geschlechts waren. Die Mehrbeteiligung des weiblichen Geschlechts an der Erkrankungsziffer könnte in der heutigen Zeit eine ausreichende Erklärung dafür geben. Es ist aber auch aus früheren Zeiten eine bekannte und vielfach festgestellte Tatsache, daß das weibliche Geschlecht mehr zum Dauerausscheidertum neigt als das männliche. Die Ursache dafür wird in der erhöhten Disposition des weiblichen Geschlechtes zu Gallenblasenaffektionen gesehen.

Die *Acme* des Paratyphus wie des Typhus fällt in die heißen Monate, und zwar liegt der Höhepunkt des Paratyphus im August, der des

Typhus im September, wie die aus einer früheren Arbeit entnommene, beigefügte Kurve zeigt. Die Typhuskurve für 1920—1924 ist deswegen mit eingezeichnet, weil sie einen doppelten Gipfel aufweist, auf den in der Anmerkung auf S. 657 hingewiesen wurde.

Der Grund für dieses Verhalten der Kurve wird von den Anhängern der Pettenkoferschen Lehre in dem Sinken des Grundwasserspiegels während der heißen Monate gesehen. Wie dem auch sei, jedenfalls spricht das Zusammenfallen der Kurven beider Erkrankungen für eine ähnliche Verbreitungsart der Erreger und ist meines Erachtens auch ein Beweis für die Berechtigung, den Paratyphus von den Fleischvergiftungen zu trennen. Zeichnet man nämlich eine Kurve der Fleischvergiftungen, so ergibt sich eine gleichbleibende Häufigkeit durch das ganze Sommerhalbjahr hindurch, die im Winterhalbjahr um rund 50% sinkt [*Bitter*[17]), *Weigmann*[18])].

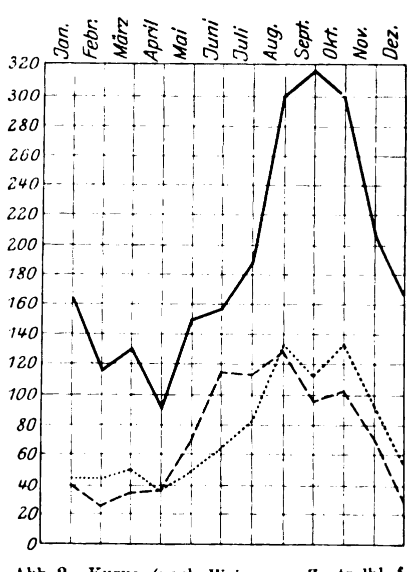


Abb. 2. Kurve (nach *Weigmann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I., Orig. 95, S. 396).
——— Typhus 1914—1924.
– – – – Paratyphus 1914—1924
········ Typhus 1920—1924

Die dauernde *Zunahme des Paratyphus B* in der Provinz seit 1914 ist schon in früheren Arbeiten dargestellt worden [*Bitter*[17]), *Weigmann*[18])]. Ich kann mich daher an dieser Stelle mit dem Hinweis darauf begnügen. Der Grund für diese Beobachtung wurde in der Zunahme unbekannter Dauerausscheider vermutet, die sich bei dem im allgemeinen weniger schweren Verlauf des Paratyphus als Leichterkrankte der ärztlichen Behandlung und Beobachtung entzogen hatten und dann zu Dauerausscheidern wurden, und deren Existenz daher dem Arzte verborgen bleibt.

Zusammenfassung.

1. Die jährliche Typhuserkrankungsziffer der Provinz Schleswig-Holstein 1914—24 beträgt 2,84 auf 10 000 Einwohner. Die Kreise der Westküste sind besonders befallen, die kleinen Landstädte mehr als die großen Städte und das flache Land.

2. In den Altersklassen der Kriegsteilnehmer zeigt sich eine Mehrbeteiligung des weiblichen Geschlechts an der Typhusmorbidität um mehr als das Doppelte. Da dieselbe Beobachtung auch beim Paratyphus

zu machen ist, ist es unwahrscheinlich, daß die Ursache dafür, wie andere Autoren vermuten, in einer Nachwirkung der Typhuschutzimpfung im Kriege zu suchen ist. Eine befriedigende Lösung der Frage wird nicht eher möglich sein, als bis weitere Untersuchungen aus anderen Gegenden Deutschlands vorliegen, die sich nicht allein auf den Typhus beschränken.

3. Der Paratyphus B ist in Schleswig-Holstein recht verbreitet. Die jährliche Erkrankungsziffer beträgt 1914—24 0,69 auf 10 000 Einwohner. Es ist seit 1914 eine dauernde Zunahme des Paratyphus B und Abnahme des Typhus abd. festzustellen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Rimpau*, Münch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 46, S. 1964. — [2]) *Fischer, B.*, Klin. Jahrb. **15**, 92. 1905. — [3]) *Müller, R.*, Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 471. — [4]) *Wolter, F.*, Aufgaben und Ziele der epidemiologischen Forschung. Hamburg: C. Behre 1925. — [5]) *Hage*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **92**, 9. — [6]) *Scheven, K.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, Heft 2, S. 261. — [7]) *Abel, R.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **103**, 223. 1924. — [8]) *Friedberger*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **28**, 119. 1919. — [9]) *Spät, W.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **46**, Heft 3. 1926. — [10]) *Hübener, E.*, Paratyphus. Im Handbuch der ärztlichen Erfahrungen im Weltkriege 1914—1918. Bd. VII. Hygiene. — [11]) *Peller*, Dtsch. med. Wochenschr. 1924, S. 1465. — [12]) *Neufeld* und *Hüne*, Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt **25**. 1907. — [13]) *Kutscher* und *Meinicke*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **52**, 301. — [14]) *Baumgärtel*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **27**, 333. 1918. — [15]) *Herz*, Wien. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 37, S. 1157. — [16]) *Havemann*, Inaug.-Diss. Kiel 1922. — [17]) *Bitter, L.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **85**, Heft 2. — [18]) *Weigmann, F.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **95**, 396. 1925.

(Aus dem Staats-Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. — Direktor Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *Kolle* — und dem Institut für experimentelle Medizin in Leningrad. — Direktor: Professor *Wladimiroff*).

Zur Biologie der Dysenterieerreger mit besonderer Berücksichtigung der Katalasereaktion.

Von

O. Hartoch, H. Schlossberger und W. Joffe.

Trotz der vielen Arbeit, die auf dem Gebiete der bakteriologischen Dysenterieforschung während der letzten 2 Jahrzehnte geleistet worden ist, kann auch heute noch von einer einheitlichen Auffassung des Dysenterieproblems wohl kaum die Rede sein. Es bestehen hier noch mancherlei Widersprüche, die sich sowohl auf Fragen der Ruhrätiologie als auch auf das Problem der Klassifikation der betreffenden Erreger beziehen. Wenn auch bezüglich der kulturellen und serologischen Sonderstellung der Shiga-Krusestäbchen und ihrer ätiologischen Bedeutung kaum ernstere Meinungsverschiedenheiten bestehen, so beginnen sie um so schwerwiegender, sobald man diese streng umgrenzte Bakteriengruppe verläßt.

Was zunächst die Klassifikation anbetrifft, so ist wohl zur Zeit kein Zweifel darüber vorhanden, daß das verschiedentliche Verhalten der einzelnen mannitvergärenden Stämme zur Maltose und in 2. Linie zur Saccharose keineswegs seine ursprüngliche Geltung als Einteilungsprinzip beibehalten hat. Nachdem die Krusesche Schule die Unbeständigkeit solcher zuckerspaltenden Fähigkeiten bei den entsprechenden Ruhrerregern dargetan hat, und nachdem analoge Beobachtungen von verschiedenster Seite die Krusesche Behauptung bestätigt haben, kann zur Zeit das Verhalten der mannitvergärenden Dysenteriestämme zu den obigen Disacchariden wohl kaum als Klassifikationsunterlage weiter verwertet werden.

Dem vergeblichen Versuche, die Gruppierung der Dysenterieerreger auf Grund ihres Gärungsvermögens durchzuführen, steht das Krusesche Verfahren, das auf dem Agglutinationsphänomen mit Einschluß des Absättigungsversuches nach *Castellani* beruht, gegenüber. Die von den Shiga-Kruseerregern abweichenden Stämme, die von *Kruse* unter dem Sammelnamen Pseudodysenterie vereinigt werden, sollen danach entsprechend ihrem Verhalten im Absättigungsversuch, ohne Berück-

sichtigung der zuckerspaltenden Leistungen, in serologische Rassen, deren Zahl (A—I) zur Zeit bereits 10 beträgt, eingeteilt werden. Abgesehen von gutbegründeten Einwänden gegen ein Klassifikationsprinzip, das methodologisch auf einem recht umständlichen Verfahren aufgebaut ist und welches kulturell durchaus ungleichwertige Arten (Rasse E und I) zusammenfaßt, hat es sich gezeigt, daß die serologische Einordnung der verschiedenen Ortes isolierten Dysenterieerreger in die obigen Rassen keineswegs immer möglich ist. Daß bisher das Krusesche Einteilungsprinzip sich kaum irgendwo eingebürgert hat, bezeugt nur, wie wenig es den praktischen Anforderungen der Bakteriologie Genüge leistet.

Ein weiteres Einteilungsprinzip, das die Dysenterieerreger in toxische und giftarme Erreger scheidet und welches auf dem Verhalten der einzelnen Stämme im Tierversuch basiert, steht allzuoft in schroffem Widerspruch zum Geschehen am Krankenbett und zum Sektionsbefund der humanen Pathologie. Diese Tatsache allein dürfte genügen, um weder der Bezeichnung „giftarm“ beizustimmen, noch die Wahl eines ausschließlich im Tierexperiment und auch dort nicht immer gültigen Kriteriums als Unterlage einer Klassifikation gutzuheißen.

Eine beträchtliche Schwierigkeit bei der Klassifikation der Dysenterieerreger bedeuten ferner diejenigen Stämme, bei denen auch der Mannitnährboden als differentialdiagnostisches Moment versagt (Krusesche Rasse I, Schmitzbacillus, Paradysenterie Stutzer, serologische Rasse Rappoport), die biochemisch im wesentlichen nur durch die wenig ausgesprochene Indolreaktion von der echten Shiga-Kruse-Ruhr abgetrennt werden können. Da zudem die agglutinatorischen Eigenschaften dieser Stämme keine Übereinstimmung zeigen, wird ihre Klassifizierung weiterhin erschwert. Berücksichtigt man ferner die von *Braun*, *Liess* und *Ornstein* beschriebenen dysenterieähnlichen und dysenterievortäuschenden Mikroben, den Bacillus fallax und den Bacillus inconstans, so muß zugestanden werden, daß eine glückliche Lösung des Klassifikationsproblems innerhalb der Dysenteriegruppe noch bei weitem nicht erzielt ist.

Auf Grund der Erfahrungen über das serologische Verhalten der in der Gruppe der Pseudodysenteriebakterien zusammengefaßten Keime, das ebenso wie dasjenige anderer Bakterienarten (Influenzabacillen, Staphylo- und Streptokokken, Proteusbacillen usw.) durch eine große Variabilität gekennzeichnet ist, sind *Braun* und seine Mitarbeiter zu der Überzeugung gekommen, daß für die Diagnostik der Ruhrerreger nur genaueste morphologische und ernährungsphysiologische Untersuchungen eine brauchbare Unterlage bilden können. Die genannten Autoren haben, unserer Ansicht nach mit Recht, die Forderung aufgestellt, daß eine Systematik der Bakterien einerseits diejenigen

Eigenschaften, welche *stets*, d. h. bei allen untersuchten Stämmen *vorhanden* sind bzw. *stets fehlen*, andererseits diejenigen Eigentümlichkeiten, welche nur bei einem Teil der Stämme, also in *schwankender* Intensität nachgewiesen werden können, berücksichtigt. Sie sind daher der Ansicht, daß für diese Zwecke der Systematik eine größere Anzahl ernährungsphysiologischer Eigenschaften festgestellt werden muß. Entsprechend dem kulturellen Verhalten trennen sie von den Shiga-Kruseschen Dysenteriebakterien die sogenannten Kolitisbacillen ab, welche sich vor allem durch die Eigenschaft, Mannit unter Säurebildung zu spalten, von den Angehörigen der erstgenannten Gruppe scharf unterscheiden lassen (betreffs Einzelheiten sei auf die Arbeiten von *Braun* und seinen Mitarbeitern verwiesen). Während also die *Mannitvergärung* ein *konstantes* Merkmal der Kolitisbacillen darstellt, finden sich die Fähigkeit der *Indolbildung* und der *Maltosespaltung* nur in wechselnder Stärke und sind daher als *schwankende* Eigenschaften anzusprechen. Es wären somit unter den Kolitisbakterien diejenigen Arten von Dysenterieerregern zusammenzufassen, die ohne Berücksichtigung des serologischen Verhaltens auf Grund des Ausschlages des Maltosennährbodens als Hiss-Russel-Stämme bzw. als Flexner-Stämme zu gelten hätten. Sprechen die eigenen Erfahrungstatsachen, wie bei uns, für die Richtigkeit der Kruseschen Behauptung von der fehlenden Eignung des Maltosennährbodens für die kulturelle Abgrenzung von Hiß- und Flexner-Bacillen, so ist die Zusammenfassung solcher Kulturen unter einem Einheitsbegriff, gleichviel wie man sie benennen mag, nicht mehr als eine logische Notwendigkeit. Daß bei solcher Einstellung zur Differenzierungsfrage die Kolitisstämme nicht in Abhängigkeit von ihrem agglutinatorischen Verhalten zu „Flexner-“ und „Hiss-Serum“ serologisch gegliedert werden dürfen, ist selbstverständlich, falls man an der Definition (*Flexner* bzw. *Hiss*) nicht mehr festhält.

In Anbetracht der Tatsache, daß die große Mehrzahl der hierhergehörigen Kulturen, speziell die epidemiologisch zusammengehörenden Stämme, in agglutinatorischer Hinsicht vielfach eine weitgehendste Gruppengemeinschaft aufweisen, besitzt neben den kulturellen Eigentümlichkeiten auch das serologische Verhalten der Kulturen eine diagnostische Bedeutung. Negative Agglutinationsergebnisse haben indessen, worauf *Braun* und seine Mitarbeiter hinweisen, für die Entscheidung der Frage, ob Ruhrbacillen vorliegen, keinerlei Bedeutung; nur positive Resultate sind für diese diagnostischen Zwecke verwendbar.

Bei dem auch heute noch bestehenden Widerstreit hinsichtlich der Klassifikation der Dysenterieerreger ist das Bestreben durchaus verständlich, den Kreis der artbestimmenden Merkmale zu erweitern. Bei unseren diesbezüglichen Untersuchungen, über deren Ergebnisse

im nachfolgenden kurz berichtet werden soll, richteten wir unser Augenmerk auf 2 Verfahren, welche in der Diagnostik der Dysenterieerreger bereits Anwendung gefunden haben.

Die systematischen Untersuchungen von *Braun* und seinen Mitarbeitern über den *Verwendungsstoffwechsel* der Bakterien, die bereits manches Interessante speziell auf dem Gebiete der Biologie der Typhusgruppe zutage gefördert haben und die in geringerem Umfange auch auf die Dysenterieerreger ausgedehnt worden sind, wiesen den einen Weg, den wir bei der Untersuchung eines größeren Dysenteriematerials einschlugen. Der zweite Weg war durch die Arbeiten von *Knorr*, *Keck* u. a., die das Verhalten der *Katalasereaktion* als differentialdiagnostisches Moment, speziell bei der Dysenteriegruppe studiert hatten, vorgezeichnet.

Was die Methodik der Verwendungsstoffwechselversuche anlangt, so hielten wir uns prinzipiell an den von *Braun* eingeschlagenen Weg. Wir wichen zwar von der Technik *Brauns* in einem nicht unwesentlichen Punkte insofern ab, als wir von der Verwendung flüssiger Nährböden mit Serienpassagen absahen und ausschließlich mit festen Agarnährböden arbeiteten. Da es sich bei unseren Untersuchungen nicht um die Bearbeitung der mehr theoretischen Frage nach der Verwendungsmöglichkeit des einen oder des anderen N- oder C-haltigen Nährstoffes, die ja zum großen Teile schon durch die Braunschen Arbeiten eine hinreichende Klärung erfahren hat, sondern um die Feststellung quantitativ greifbarer Unterschiede in der Verwendungsmöglichkeit handelte, so war die Wahl fester synthetischer Nährböden der gegebene Weg.

Zu unseren Untersuchungen standen uns außer einer größeren Sammlung von Dysenteriestämmen, die uns durch Herrn Prof. *Gildemeister* und Herrn Prof. *Braun* aus den Sammlungen des Reichs-Gesundheitsamtes in Berlin und des Hygienischen Institutes der Universität Frankfurt a. M. in liebenswürdiger Weise überlassen worden waren (Museumsstämme), noch 83 Dysenteriestämme, die der eine von uns während der Sommerepidemie 1924 in Leningrad gezüchtet hatte, zur Verfügung. Die Untersuchungen über den Verwendungsstoffwechsel wurden ausschließlich an den Museumsstämmen durchgeführt, während für die Katalaseuntersuchungen sowohl diese wie auch die frischgezüchteten Stämme verwendet wurden.

Nach einer Reihe von orientierenden Vorversuchen verwendeten wir 2 synthetische Nährböden von folgender Zusammensetzung:

Nährboden I: Aspargin 1,0; Acid. lactic. 0,5; Natr. citric. 0,1; K_2HPO_4 0,1; KNO_3 0,025; $MgSO_4$ 0,025 auf 100 ccm Wasseragar.

Nährboden II: Ammon. lactic. 0,5; Natr. citric. 0,1; K_2HPO_4 0,1; KNO_3 0,025; $MgSO_4$ 0,025 auf 100 ccm Wasseragar.

Die Resultate unserer Untersuchungen über die Verwendung von Asparagin bzw. Ammoniak als Stickstoffquellen in Gegenwart von Milch- und Zitronensäure als Kohlenstoffquellen durch Dysenteriestämme der verschiedenen Gruppen sind in der nachfolgenden Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Bezeichnung der Stämme	Zahl	Wachstum auf Nährboden I			Wachstum auf Nährboden II		
		+++	+	-	+++	+	-
Shigastämme	21	—	—	21	—	—	21
Flexnerstämme	6	3	1	2	3	—	3
Y-Stämme	11	1	—	10	1	2	8
Schmitzstämme	4	—	—	4	—	—	4
Inkonstansstämme	2	1	1	—	1	1	—
Fallaxstämme	1	—	1	—	—	1	—

Anmerkung: Das Wachstumsresultat wurde nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt vermerkt.

+++ = intensives Wachstum
+ = schwaches Wachstum
— = makroskopisch nicht nachweisbares Wachstum.

Aus diesen Versuchsergebnissen geht hervor, daß von 21 geprüften Shigakulturen kein einziger Stamm auf den genannten Nährböden innerhalb der ersten 24 Stunden ein makroskopisch sichtbares Wachstum zeigte. Von 6 Maltose vergärenden, als Flexner bezeichneten Stämmen wuchsen 3 Stämme auf beiden Nährböden [Flexner-Wien, (Reichs-Ges.-Amt), Flexner, Inst. f. experimentelle Therapie, Frankfurt a. M., Flexner Nr. 44, Hygien. Institut Frankfurt a. M.] üppig, 2 Stämme (Flexner-Sammlung, Inst. f. experim. Therapie, Frankfurt a. M., Flexner, Reichs-Ges.-Amt) verhielten sich wie die Shigastämme und 1 Stamm (Flexner Ditthorn, Reichs-Ges.-Amt) ergab auf dem Asparginnährboden ein sehr kümmerliches Wachstum, das auf dem Ammonium lacticum-haltigen Nährboden noch schwächer war. Von 11 Stämmen, die als Y bezeichnet waren, verhielten sich 10 wie Shigastämme und nur 1 Stamm (Y Baumann) ergab auf beiden Medien ein gutes Wachstum. Beim Ablesen des Wachstumsergebnisses nach 48 Stunden änderte sich das Bild insofern, als zu diesem Zeitpunkt auch 2 Stämme der Shigagruppe gutes Wachstum zeigten (Shiga Greifswald und Shiga Schubhahn) und auch bei verschiedenen Stämmen der Y-Gruppe eine sichtbare Bakterienentwicklung festzustellen war.

Aus den geschilderten Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß die Verwendungsmöglichkeit der verschiedenen Stickstoffquellen bei den einzelnen Stämmen *stark variiert* und *keinen Zusammenhang mit dem Verhalten der Kulturen zu Mannit und Maltose* erkennen läßt. Diese Feststellung, daß zwischen den einzelnen Dysenteriestämmen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, einfache Stickstoffverbindungen zu assimilieren, beträchtliche quantitative Unterschiede vorhanden sind, steht in bestem Einklang mit den Ergebnissen der Braunschen Untersuchungen über Ammoniakassimilation der Shigabakterien und der

Angehörigen der Kolitisgruppe. Es ergibt sich daraus, daß selbst bei Annahme einer bei den Dysenteriestämmen allgemein verbreiteten potentiellen Fähigkeit, den Stickstoff in Form von Asparagin und Ammonium-Verbindungen zu assimilieren, solche potentielle Energie von den einzelnen Stämmen sehr verschieden stark ausgenützt wird. Die Frage, ob solche Stämme, die den Stickstoff in einfacher Form energisch anzugreifen vermögen, auch noch durch weitere gemeinsame kulturelle bzw. serologische Merkmale gekennzeichnet sind, muß, soweit unsere Erfahrungen reichen, verneint werden.

Aus der nachfolgenden, als Beispiel angeführten Tab. 2, in der neben der Intensität der Ammoniakverwertung gleichzeitig auch das agglutinatorische Verhalten gegenüber einem Kaninchen-Immunserum, das mit dem Flexnerstamm „Institut f. experimentelle Therapie, Frankfurt a. M.“, hergestellt worden war, sowie der Grad der Maltosevergärung der entsprechenden Stämme eingetragen sind, geht hervor, daß *keinerlei Wechselbeziehungen zwischen den genannten kulturellen Eigenschaften und dem serologischen Verhalten* nachgewiesen werden können. Auch bei Prüfung der Kulturen mit Immunsera, die mit den Stämmen „Wien“ und „Vey“ hergestellt worden waren, war das Resultat ebenfalls negativ. Auch diese Befunde decken sich vollinhaltlich mit den Untersuchungsergebnissen von *Braun* und seinen Mitarbeitern und zeigen, daß innerhalb der Kolitisgruppe das Verhalten der Kulturen gegenüber dem Ammoniak durchaus schwankend und als Klassifikationsunterlage für eine weitere Aufteilung der hierher gehörigen Stämme nicht verwendbar ist. Die positive Maltosevergärung bei den als Y bezeichneten Stämmen Reck und Baumann, darf in Anbetracht der Erfahrungstatsache, daß innerhalb der Kolitisgruppe das Verhalten der einzelnen Stämme gegenüber der Maltose außerordentlichen Schwankungen unterworfen ist, nicht wundernehmen.

Tabelle 2.

	Stämme	Intensität der Maltosevergärung	Intensität der Ammoniakverwertung	*Agglutination* mit Kaninchen-Immunserum „Flexner, Institut f. exper. Ther. Frankfurt a. M.“			
				1 : 100	1 : 1000	1 : 2000	1 : 4000
Als Flexner bezeichnete Stämme	Sammlung R.-Ges.-Amt . . .	++	±	++	++	—	—
	Wien, „	+++	+++	++	—	—	—
	Vey, „ . . .	+	±	++	—	—	—
	Ditthorn, „ . . .	++	+	++	—	—	—
	Inst. f. exp. Therapie Frankfurt a. M.	+	+++	+++	+++	++	++
	Hyg. Inst. Frankf. a. M. Nr. 44	+++	+++	+++	+++	++	—
Als Y bez. St.	Reck, R.-Ges.-Amt	++	+	++	++	++	—
	Baumann, „	+++	+++	++	+	±	—
	Robert Koch, R.-Ges.-Amt . .	—	±	++	++	++	—

Seit *Gottstein* 1893 als erster darauf hinwies, daß einige Bakterienarten befähigt sind, aus Wasserstoffsuperoxyd molekularen Sauerstoff abzuspalten, wird die *Katalasereaktion* in der Bakteriologie zu Differenzierungszwecken verwendet. Die Arbeiten von *Löwenstein* über die positive Katalasereaktion von Diphtherie- und Staphylokokkenfiltraten und die fehlende Katalasewirkung von Filtraten der Tetanuskulturen, weiterhin *D.* und *M. Rywoschs* Gegenüberstellung von Aerobiern und Anaerobiern im Sinne der Katalasewirkung, sowie *Jenssens* Arbeiten über fehlende Katalasereaktion bei den Säurebildnern aus der Gruppe der Milchbakterien, *Jörns* Untersuchungen über Ekto- und Endokatalase, bis zu den jüngsten Arbeiten von *MacLeod* und *Gordon*, *Callow*, *Knorr*, *Keck*, *Schlunk* u. a. mögen als Belege hierfür angeführt sein.

Ausgehend von der *Knorr*schen Beobachtung über das verschiedene Verhalten der Shigastämme und der übrigen Dysenterieerreger zum Wasserstoffsuperoxyd im Sinne der Katalasereaktion, prüften wir die uns zur Verfügung stehenden Stämme auch in dieser Richtung. Die Prüfung erfolgte in der vereinfachten Keckschen Modifikation, die, wie die Kontrolluntersuchungen uns gezeigt haben, dem Knorrschen Verfahren nicht nachsteht. Das Ergebnis dieser Prüfungen ist in der nachfolgenden Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Übersicht über Katalasereaktion und Wachstumsenergie auf wasserstoffsuperoxydhaltigem Agarnährboden* (100 ccm Agar, p_H 7,0—6,8, + H_2O_2, entsprechend 0,00272 g wasserfreiem H_2O_2).

Bezeichnung der geprüften Stämme	Zahl der Stämme	Katalasereaktion			Wachstumsresultat		
		fehlend	schwach	stark	kein Wachstum	schwaches Wachstum	üppiges Wachstum
Shiga-Kruse	21	21	0	0	21	0	0
als „Y" bezeichnete Stämme .	11	0	4	7	0	3	8
als „Flexner" bezeichnete St. .	6	0	0	6	0	3	3
als „Pseudodysenterie" bezeichnete Stämme	9	1	3	5	5	2	2
als „Kolitis" bezeichnete St. .	5	0	0	5	0	2	3
Ruhr-Bärthlein	5	0	0	5	0	0	5
Schmitz	4	0	0	4	4	0	0
Inkonstans	2	0	0	2	2	0	0
Fallax	1	0	0	1	1	0	0

Wie sich aus dieser Übersichtstabelle ergibt, gehen die mit der Katalasreaktion erhaltenen Resultate mit den Angaben von *Knorr*, *Keck* u. a. insofern konform, als sämtliche Shigastämme als katalasenegativ und sämtliche Kolitisstämme mit Ausnahme der Pseudo-

dysenterie-Leipzig D 395 katalasepositiv sich erwiesen. Die Intensität der Katalasereaktion ist zwar nicht in allen Fällen gleichmäßig ausgebildet, immerhin ist sie aber auch bei den nur schwach (+) reagierenden Stämmen nicht zu übersehen. Als differentialdiagnostisch erwähnenswert möchten wir darauf hinweisen, daß die Mannit nicht vergärenden Paradysenteriestäbchen (Stutzer), bzw. die Schmitzschen Stämme, sowie *Brauns* Inkonstans- und Fallaxkulturen sämtlich eine deutlich ausgesprochene Katalasereaktion geben. Diese Tatsache dürfte in Berücksichtigung ihrer großen kulturellen Ähnlichkeit mit den Shigastäbchen von wesentlichem differentialdiagnostischem Werte sein.

Die in der Tab. 4 zusammengestellten Untersuchungsergebnisse, die sich auf Stämme der Dysenterieepidemie in Leningrad während des Jahres 1924 beziehen, weichen nun aber von den eben mitgeteilten Resultaten *wesentlich* ab. Bei den Shigastämmen war allerdings auch hier stets eine durchweg *negative* Katalasereaktion festzustellen. Unter 35 Kolitisstämmen fanden sich aber 7 Kulturen, die sich im Gegensatz zur Regel als *katalasenegativ* erwiesen haben, und über die der eine von uns mit *M. Rappoport* und *Linnikowa* bereits kurz berichtet hat.

Tabelle 4.

Dysenteriestämme der Leningrader Dysenterieepidemie 1924		Katalase-reaktion	Wachstum auf H_2O_2-haltigem Nähragar
Sämtliche Shigastämme		—	—
Mannit vergärende, Maltose nicht vergärende, agglutinatorisch durch Y-Serum ausflockbare Stämme	10 A	—	—
	37 B	—	—
	58/2	—	—
	114	—	—
	375/7	—	—
	841	—	—
	1049	—	—
	34 A	+++	+++
	480	+++	++
	593	++	+++
	594	+++	+
	1020	+++	+++
	1265	++	+
Museumstämme:			
Shiga, Gesundheitsamt		—	—
Shiga-Schneider, Reichsgesundheitsamt		—	—
Shiga-Herta, Hyg. Inst. Frankfurt a. M.		—	—
Y-Vandaume, Reichsgesundheitsamt		+++	+++
Y-Inst. f. experimentelle Therapie, Frankfurt a. M.		+++	++
Flexner-Wien, Reichsgesundheitsamt		+++	+++
Flexner-Vey, Reichsgesundheitsamt		+++	+++
Flexner, Inst. f. experim. Therapie, Frankfurt a. M.		+++	+++

Kulturell stimmten diese katalasenegativen Kulturen mit den katalasepositiven Kolitisstämmen überein und entsprechen allen Forderungen, die an Kolitiskulturen gestellt werden müssen.

Toxizitätsprüfungen bzw. Virulenzprüfungen der katalasepositiven und -negativen Kolitiskulturen im Mäuseversuch (intravenöse Injektion) ergaben keine durchgreifenden Unterschiede. Fast alle in dieser Hinsicht geprüften katalasepositiven wie -negativen mannitvergärenden Stämme töteten Mäuse nur in größeren Dosen von ca. 2 Ösen Agarkultur.

Zum Überfluß konnte auch auf dem Wege der Agglutination mittels verschiedener Kaninchen-Immunsera, die mit mannitvergärenden katalasepositiven Kolitisstämmen hergestellt waren, die Zugehörigkeit der katalasenegativen mannitvergärenden Kulturen zur Kolitisgruppe erhärtet werden. Auch durch Immunsera, die mit einigen als Hiß bezeichneten Stämmen des Reichsgesundheitsamtes hergestellt waren (Stämme „Altona“ und „Schladt“), wurden die katalasenegativen Kolitisstämme in gleicher Titerhöhe ausgeflockt, wie die entsprechenden katalasepositiven Stämme. Auch die im Hygienischen Institut der Universität Frankfurt a. M. unabhängig von uns vorgenommene Prüfung zweier katalasenegativer Kulturen N 37 B und 58/2, die in liebenswürdiger Weise von Herrn Prof. *Braun* veranlaßt wurde, ergab deren kulturelle Zugehörigkeit zur Kolitisgruppe. Agglutinatorisch reagierten die beiden Stämme mit einem Dysenterieserum, das im Hygienischen Institut vorrätig war.

Trotz der im einfachen Agglutinationsversuch zutage tretenden Rezeptorengemeinschaft bei den katalasepositiven und -negativen Stämmen (s. Tab. 5) ließen sich letztere von den üblichen katalasepositiven Stämmen aber doch auch serologisch abtrennen. Es konnte von einem von uns gemeinsam mit *Rappoport* und *Linnikowa* festgestellt werden, daß durch Immunisierung von Kaninchen mit den *katalasenegativen Stämmen Sera erhalten werden, die nur die homologe Kultur und die heterologen katalasenegativen Stämme bis zur Titergrenze agglutinieren, während die katalasepositiven Stämme in viel geringerem Grade ausgeflockt werden.* Diese Beobachtung konnte auch an einer weiteren Zahl unserer Stämme bestätigt werden, wie aus den in der Tab. 5 zusammengestellten diesbezüglichen Versuchungsergebnissen hervorgeht.

Das Ergebnis dieser Versuche ist unter Berücksichtigung der Agglutinationsresultate, welche mit katalasepositiven Sera[1]) erzielt wurden, nicht ohne Bedeutung für die praktische Serodiagnostik. Für die Herstellung von diagnostischen Sera, deren Agglutinationsbreite möglichst

[1]) Agglutinierende Kaninchensera, die mit katalasepositiven Stämmen hergestellt sind.

Tabelle 5.

	Stämme	Kaninchenimmunserum erzeugt durch Immunisierung mit katalasenegativem Stamm „10 A“					Kaninchenimmunserum erzeugt durch Immunisierung mit katalasenegativem Stamm 841				
		1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/5000	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/5000
Katalaseneg. St.	10 A	+++	++	++	±	—	+++	+++	+	±	—
	58/2	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+
	114	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++
	375/7	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++
	841	+++	++	++	+	+	+++	+++	++	++	+
	1049	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++
	37 B	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++
Katalaseposit. Stämme	34 A	+++	++	++	—	—	+++	+++	+	—	—
	480	+++	++	+	—	—	+++	+++	±	—	—
	593	+++	++	—	—	—	+++	+++	+	—	—
	594	+++	++	+	—	—	+++	+++	+	—	—
	1720	+++	++	—	—	—	+++	++	+	—	—
	1265	+++	++	+	—	—	+++	+	+	—	—
	Y Vand.	+++	+	—	—	—	+++	±	—	—	—
	Y Inst. f. exp.Ther.	+++	+++	++	—	—	+++	+	+	—	—

groß sein soll, wären solche katalasenegativen Stämme praktisch auszuschließen. Versuche, mit Hilfe des Castellanischen Absättigungsverfahrens einen detaillierten Einblick in die serologischen Verhältnisse zu gewinnen, führten zu recht komplizierten Wechselbeziehungen, ähnlich denen, die auch für die katalasepositiven Stämme die Regel bilden.

Das Auftreten von katalasenegativen Kolitisstämmen im Verlaufe typischer Dysenterieepidemien ist im Jahre 1925 von neuem sowohl von dem einen von uns im Erisman-Krankenhaus als auch von *Rappoport* und *Daumann* im Botkin-Hospital zu Leningrad beobachtet worden, und zwar war dieses Mal die Zahl der atypischen Stämme noch größer als im Jahre 1924. So befanden sich unter 291 mannitvergärenden Dysenteriestämmen, die im Jahre 1925 vom Laboratorium des Botkin-Hospitals isoliert worden waren, 24 (ca. 9%) solche katalasenegative Kulturen.

Das keineswegs vereinzelte, sondern mehr oder weniger gehäufte, in 2 aufeinanderfolgenden Jahren beobachtete *Auftreten von katalasenegativen Colitisstämmen im Verlauf typischer Dysenterieepidemien* spricht dafür, daß bei Nachprüfung der Katalasereaktion an einem größeren Dysenteriematerial auch andernorts solche Befunde erhoben werden können. Damit würde die Katalasereaktion als differentialdiagnostisches Moment allerdings eine wesentliche Einbuße ihrer Bedeutung erleiden.

Andererseits wäre es aber auch möglich, daß diese Stämme als epidemiologisches Charakteristikum gewisser Dysenterieepidemien eine Ausnahmestellung einnehmen. Für die Leningrader Dysenterieepidemien dürfte aber auch das vorliegende Material die Behauptung hinreichend rechtfertigen, daß das Vorhandensein von katalasenegativen Stämmen unter den mannitvergärenden, im übrigen biochemisch und zum großen Teil auch serologisch mit den sogenannten Y- und Flexnerstämmen übereinstimmenden Kulturen genügt, um die *Katalasereaktion nur mit aller Reserve im Sinne eines Unterscheidungsmerkmales* zu gebrauchen, und daß wir ferner wenigstens z. Zt. noch keine genügenden Unterlagen besitzen, die aus dem Vorhandensein bzw. dem Fehlen von Katalaseferment bestimmte Rückschlüsse hinsichtlich der Bedeutung der Katalase für den Stoffwechsel zuließen.

Es sei noch ergänzend erwähnt, daß die im Jahre 1924 isolierten katalasenegativen Stämme bei einer im Jahre 1926 wiederholten Prüfung *dasselbe negative Verhalten* aufwiesen. Auch durch titrimetrische Prüfungen, die von *M. Rappoport* und seinen Mitarbeitern vorgenommen wurden, konnte mit den besagten Stämmen keine Katalasereaktion erhalten werden. Auch zeigten die katalasenegativen Kulturen nach Passage durch den Mäuseorganismus keinerlei Änderungen im Sinne der Katalasereaktion, d. h. sie blieben katalasenegativ.

Was das Wesen der Katalasereaktion anlangt, so tritt in den meisten neueren Arbeiten eine rein teleologische Erklärungsweise in den Vordergrund, die bereits durch die *Loew*schen Vorstellungen vorgezeichnet war. Dieser Standpunkt wird besonders nachdrücklich von *Schlunk* in den Schlußfolgerungen zu seiner Arbeit „Der Zweck der Katalase bei Bakterien“, durch welche er experimentell einen Parallelismus zwischen H_2O_2-Empfindlichkeit der Bakterien und ihrem Verhalten bei der Katalasereaktion zu erweisen sucht, vertreten. Positive Katalasereaktion soll nach *Schlunk* eine erhöhte Resistenz der Bakterien gegen Wasserstoffsuperoxyd involvieren, während umgekehrt eine fehlende Katalasereaktion als Zeichen einer geringen Widerstandsfähigkeit der betreffenden Keime gegenüber Wasserstoffsuperoxyd aufgefaßt wird.

Bereits im Herbst 1924 waren analoge Versuche im Gange, die über die Wechselbeziehungen zwischen Katalasegehalt und Resistenz gegenüber Wasserstoffsuperoxyd Aufschluß geben sollten. Zur Resistenzprüfung verwendeten wir feste Nährböden (gewöhnlicher Fleischwasserpeptonagar), denen kurz vor Gebrauch Wasserstoffsuperoxyd in entsprechender Konzentration zugesetzt wurde.

Durch diese Untersuchungen konnte zunächst festgestellt werden, daß die Wirksamkeit des H_2O_2-Zusatzes von der p_H-Ausgangskonzentration des Nährbodens abhängig ist. Am zweckentsprechendsten erwies

sich für solche Prüfungen eine Ausgangskonzentration von p_H 7,0, bzw. 6,8. Werte von p_H 7,4 und p_H 7,6 waren ungeeignet, da sie keine glatten Reihen ergaben. Des weiteren wurde diejenige minimale H_2O_2-Konzentration des Nährbodens festgestellt, die bei Verwendung von Shigastämmen ein Angehen der Kultur in den ersten 24 Stunden nach der Einimpfung verhinderte.

Diese Menge beträgt 0,00272 g wasserfreien Wasserstoffsuperoxyds auf 100 ccm Agar.

Colorimetrisch durchgeführte p_H-Bestimmungen vor und nach Zusatz solcher Wasserstoffsuperoxydmengen zeigten, daß dadurch eine feststellbare Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration nicht eintritt. Die beobachtete Wachstumshemmung der Shigabakterien konnte somit keineswegs auf eine unzuträgliche p_H-Konzentration des Agars zurückgeführt werden, um so mehr als eine Wasserstoffionenkonzentration von p_H 6,6 noch ein ausgiebiges Wachstum eingeimpfter Shigabakterien gestattet. Die Resultate der Prüfung sind in Tab. 3 und 4 zusammengestellt.

Wie sich aus diesen Tabellen ergibt, besteht bei den verschiedenen Dysenteriestämmen ein verhältnismäßig deutlich *ausgeprägter Parallelismus zwischen dem Ausfall der Katalasereaktion und der Toleranz der betreffenden Kulturen gegenüber dem Wasserstoffsuperoyxd*, der auch insofern in die Erscheinung tritt, als sämtliche 7 katalasenegativen mannitvergärenden Stämme der Leningrader Epidemie 1924 auf dem H_2O_2-Agarnährboden sich analog den Shigastämmen verhalten, während 6 aus der gleichen Epidemie stammende katalasepositive mannitvergärende Kulturen, die zur Kontrolle herangezogen wurden, durchweg ein mehr oder weniger gut ausgesprochenes Wachstum zeigten.

Immerhin ist die Übereinstimmung der Prüfungsresultate aber doch *keine so vollständige*, daß sie zu weitgehenden Schlußfolgerungen in dem obengenannten Sinne berechtigen würde. Die ausgesprochene Empfindlichkeit einiger zur Kruseschen Pseudodysenteriegruppe gehörender Ruhrstämme gegenüber Wasserstoffsuperoxyd, die gleiche Empfindlichkeit der Schmitz- und Inkonstans-Stämme, die eine gut ausgeprägte Katalasereaktion zeigten, veranlassen uns von einer Deutung der Beobachtungen im Sinne zwangsmäßiger Wechselbeziehungen zwischen beiden Erscheinungen abzusehen.

Was die Verwertbarkeit des Toleranzphänomens der einzelnen Dysenteriestämme gegenüber Wasserstoffsuperoxyd für praktische differentialdiagnostische Zwecke anlangt, so glauben wir, ihm keine besondere Bedeutung zumessen zu können. Bei dem relativ gut ausgeprägten Parallelismus der Toleranz gegen Wasserstoffsuperoxyd mit den Katalasereaktionen nach *Knorr* oder *Keck* haben die letzteren den großen Vorteil der methodologichen Einfachheit auf ihrer Seite und

leisten prinzipiell das gleiche. Ein weiteres systematisches Studium des Katalaseproblems an einem großen Material wird am ehesten zur Klärung der Frage, inwieweit dieses Kriterium für die praktische Bakteriologie von Wert sich erweisen wird, beitragen.

Zusammenfassung.

1. Bei den verschiedenen Arten von Dysenteriebakterien läßt sich kein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der einzelnen Stämme zu Mannit und Maltose einerseits und ihrer Fähigkeit, einfache Stickstoffquellen (Ammoniak, Asparagin) zu assimilieren, anderseits feststellen.

2. Bei den mannitvergärenden Stämmen, den sogenannten Kolitis-Bakterien bestehen zwischen der Intensität der Ammoniakverwertung, dem Verhalten gegenüber Maltose und den serologischen Eigentümlichkeiten ebenfalls keine Wechselbeziehungen.

3. Da nicht nur die Shiga-Kruseschen Bakterien, sondern gelegentlich auch Angehörige der Kolitisgruppe Wasserstoffsuperoxyd nicht zu zersetzen vermögen, kann die Katalasereaktion nur mit einer gewissen Reserve zur Unterscheidung der Dysenterieerreger herangezogen werden.

4. Die katalasenegativen mannitvergärenden Dysenteriestämme lassen sich von den katalasepositiven Kolitisstämmen auch auf serologischem Wege abtrennen.

Literaturverzeichnis.

Braun, H. u. *W. Liess,* Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **88**, 251. 1919. — *Liess, W.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. 1, Orig. **83**, 193. 1919. — *Ornstein, M.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **91**, 152. 1920. — *Braun, H.*, Zeitschr. f. klin. Med. **91**, 304. 1921. — *Braun, H.* u. *C. E. Cahn-Bronner,* Biochem. Zeitschr. **131**, 226. 1922. — *Callow, A. B.*, Journ. of pathol. a. bacteriol. **26**, 320. 1923. — *Knorr, M.*, Münch. med. Wochenschr. **70**, Nr. 46, S. 1381. 1923. — *Keck, A.*, Münch. med. Wochenschr. **71**, Nr. 9, S. 272. 1924. — *McLeod, J. W.*, u. *J. Gordon,* Journ. of. pathol. a. bacteriol. **26**, 326. 1923. — *Rywosch, D.* u. *M. Rywosch,* Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. 1, Orig. **44**, 295. 1907. — *Schlunk, F.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **92**, 116. 1924. — *Hartoch, O, M. A. Rappoport, Linnikowa* u. a., Journ. f. Mikrobiologie, Epidemiologie u. Infektionskrankheiten **2**, Heft 2/3. 1925.

(Aus dem Institut „Robert Koch", Berlin.)

Studien an Diphtheriebacillen.

I. Die Umwandlung echter Diphtheriebacillen in Diphtheroide in vitro und in vivo mit Ein-Zell-Kulturen.

Von

Walter Levinthal,

Assistenten am Institut.

Mit 1 Textabbildung.

Fast so alt, wie die Kenntnis vom Erreger der Diphtherie ist das Problem, in welcher Beziehung die von *Löffler* und *Hofmann* zuerst beschriebenen Pseudodiphtheriebacillen und die Xerosestäbchen zum giftigen Bacillus Löffler stehen. Noch heute finden wir die Lager der Unitaristen, die in beiden Keimformen Varianten einer einzigen Bakterienart sehen, und der Dualisten, die beides für selbständige, also gute Arten halten, im Widerstreite. Es leuchtet ein, daß das Studium dieser Frage auf Grund klinisch-bakteriologischer Beobachtung, an der Hand der Analyse kasuistischer Befunde zwar Anregungen genug empfangen kann, aber niemals eindeutiger Klärung zuzuführen sein wird.

In der Tat ist die *experimentelle* Bearbeitung des Problems seit langem die Methode der Wahl. Eine ausführliche Besprechung der Literatur soll hier unterbleiben; es genüge kurz auf die Publikationen von *Bernhardt* und *Paneth* sowie *Schmitz* hinzuweisen. Einmal teilten *Bernhardt* und *Paneth*[1]) auf dem Mikrobiologentag 1913 mit, daß es ihnen geglückt sei, echte Diphtheriebacillen experimentell in Diphtheroide, sei es vom Hofmann-, sei es vom Xerosetyp, umzuwandeln, und zwar erstens durch Abimpfung charakteristisch veränderter Kolonien, die aus alten Agar- oder Bouillonkulturen aufgingen, zweitens durch Passage von Meerschweinchen nach intravenöser Einspritzung und Wiedergewinnung aus der Milz und drittens in vitro durch Meerschweinchenserum; ausführlich stellte *Bernhardt*[2]) ein Jahr später die Versuche dar. Und weiter stu-

[1]) *Bernhardt* und *Paneth* (Institut „Robert Koch"). Über die Variabilität des Diphtheriebacillus. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Ref. **57**, 83. 1913 (Anhang).

[2]) *Georg Bernhardt*, Über Variabilität pathogener Bakterien. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **79**, 179. 1914.

dierte *K. E. F. Schmitz*[1]) bei *Römer* sorgfältig die nach Meerschweinchenpassage typischer Diphtheriebacillen wiedergewonnenen Pseudodiphtheriestämme in ihren wichtigsten Unterscheidungsmerkmalen und unter zahlreichen Kontrollen von Normaltieren, während der überzeugendere Reagensglasversuch in seiner Hand zu keinen Ergebnissen führte.

Trotz der zahlreichen Kontrollen wird gegen die Tierversuche von den Dualisten der Einwand aufrecht erhalten, daß bei der weiten Verbreitung von Diphtheroiden bei Mensch und Tier die Beziehung der wiedergewonnenen Stämme zum Injektionsmaterial nicht eindeutig sei. Vor allem aber wird, nicht mit Unrecht, auch gegen das Reagensglasexperiment von *Bernhardt* und *Paneth* eingewandt, daß möglicherweise von dem nur scheinbar reinen Ausgangsstamm einzelne Pseudokeime mitgeschleppt und nachträglich herausgezüchtet wurden. Es läßt sich nicht leugnen, daß bei den stark aneinander haftenden Bakterien der Diphtheriegruppe auch eine längere Fortzüchtung unter isolierter Abimpfung von Einzelkolonien keine Garantie im Sinne der reinen Reihe bietet.

In der Tat sei auf Grund meiner Beobachtungen bei dem gleich zu schildernden Ein-Zell-Verfahren betont, daß in der Bakteriologie bei der fraktionierten Aussaat von Bakterienstämmen mit Hilfe des Spatels allzu unbedenklich Kolonie gleich reine Reihe gesetzt wird; dicht beieinander zur Aussaat gelangende Keime geben bei der Vermehrung das gleiche kreisrunde, geschlossene Koloniebild wie die einzelne Bakterienzelle. Ich entsinne mich der Beobachtung *Conradis* in einem Kriegslaboratorium, daß die Kolonien, die aus vorher agglutinierten Typhusbacillen wachsen, sich weder in Form noch in Größe von den Kolonien separat ausgesäter Keime unterscheiden (private Mitteilung während des Krieges). Und neuerdings erwähnt *Gins* eine alte Feststellung an einem Paratyphusstamm, dessen Symbiose mit Spirillum alcaligenum auch nach 30maliger „Reinzüchtung" von der einzelnen Kolonie aus nicht getrennt werden konnte.

So schien es mir der Mühe wert, die von den Dualisten beanstandete Lücke in der Beweisführung der genannten Autoren auszufüllen, nachdem ich ein ungemein einfaches Ein-Zell-Verfahren am Rockefeller-Institut in New York durch *Reimann*[2]) kennengelernt hatte. In einer geringfügigen Modifikation hat sich mir diese Methode seitdem selbst bei schwer verteilbaren Bakterienarten vorzüglich bewährt; sie benötigt keine besondere, kostspielige Apparatur, verlangt keine spezielle technische Einarbeitung. Die einzige Voraussetzung ist eine erstklassige

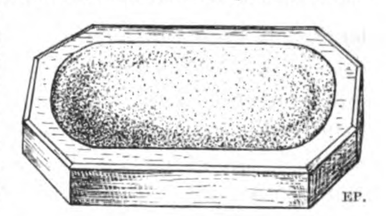
[1]) *K. E. F. Schmitz* (Halle), Die Verwandlungsfähigkeit der Bakterien. Habilitationsschrift. Jena: G. Fischer 1916.

[2]) *Hobart A. Reimann* (Rockefeller Institute), Variations in specificity and virulence of Pneumococci during growth in vitro. Journ. of exp. med. **41**, 587. 1925.

Trockenoptik (Objektiv 10fach und 40fach, Okular 5 × und 20 ×) und eine zweckmäßige Nährbodenschale, die ich bei der Firma Carl Geyer[1]) habe herstellen lassen.

Methodik.

Diese „Objektträgerwanne" (siehe Abbildung) ist aus einem 10 mm starken Stück Glas von $7^3/_4$ cm Länge und 5 cm Breite mit abgestumpften Ecken so geschnitten, daß sie zur Heißluftsterilisation in eine gewöhnliche Petrischale gestellt werden kann. Der Glasblock trägt eine ovale Vertiefung von ca. 6,5 cm Länge, $4^1/_4$ cm Breite und 8 mm Tiefe mit mattiertem Boden, in die geeigneter Nähragar gegossen wird. Das Nährmedium muß völlig durchsichtig sein; die Verwendung von Blutmischagar verbietet sich von selbst; für anspruchsvolle Bakterienarten benutze ich ausschließlich den völlig transparenten Kochblutagar (Levinthalagar). Auf dem erstarrten Agar werden die möglichst sorgfältig in Bouillon oder Kochsalzlösung suspendierten Bakterien oder Bouillonkulturen in geringster Menge mit einem zweckmäßig gebogenen Glasspatel gründlich ausgespatelt. Auf diese Weise kommt man selbst bei ungewöhnlich schwer zu homogenisierenden Bakterien, wie Streptokokken und Milzbrandbacillen, mühelos zu einzeln gelegenen Keimen. Nach der Aussaat wird die Wanne auf dem großen Kreuztisch fixiert und nun bei künstlicher Beleuchtung unter starker Abblendung und gesenktem Kondensor mit Objektiv 40 (DD) und Okular 5 × (Kompensation 4, Huygens 2) also in 200facher Vergrößerung, mikroskopiert. Selbst bei kleinen Bakterienarten gelingt es nach einiger Übung leicht, die Mikroorganismen scharf zu erkennen und einzeln gelegene Keime ausfindig zu machen.



Während nun *Ørskow*, der wohl als erster Einzelkeime auf Agar mikroskopiert hat, den genau in die Mitte eingestellten Keim mit einer Platinnadel, die in einer zweiten Fassung des Revolvers ebenfalls exakt zentriert ist, durch Senken des Tubus harpuniert und in Bouillon verimpft, gehe ich nach *Reimann* viel einfacher und zuverlässiger zugleich vor. Ist eine einzige Bakterienzelle in einem sonst leeren Gesichtsfeld eingestellt, so wird der Tubus gehoben und die Wanne mit einer entsprechend großen Glasscheibe, die an 2 Ecken leicht vaseliniert ist, bedeckt. Noch durch die Deckscheibe hindurch kann der eingestellte Keim mit schwachem Objektiv und starkem Okular erkannt und seine Vermehrung fortlaufend beobachtet werden. Um das allzu starke Heranwachsen der Kolonien, das die Gefahr des Konfluierens mit sich bringt, zu verhüten, kommt das Mikroskop mit fixierter Wanne zweckmäßig nur auf 25° (auf den Brutschrank). Nach 24 Stunden wird die kleine Kolonie, die innerhalb des eingestellten Gesichtsfeldes herangewachsen ist, mit feinst ausgezogener Capillare unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung (50fach) oder unter der Lupe abgeimpft. Schnell wachsende Keime können bereits nach 6—8 Stunden 37°-Bebrütung zur Abimpfung reif sein.

Dem Mißstand, daß in der geschilderten Weise immer nur eine einzige Ein-Zell-Kultur aus dem Material gewonnen werden kann, ist leicht abzuhelfen. Ich suche bei jeder Wannenaussaat eine beliebig große Zahl von Gesichtsfeldern mit je einem einzigen Keim auf und protokolliere sie mit dem Nonius.

Es sei erlaubt, über den Rahmen dieser Mitteilung hinaus einige Fingerzeige für andere Bakterienarten zu geben. Bei den schnell absterbenden *Pneumokokken* ist der Prozentsatz nicht mehr angehender Zellen bei Ausspatelung 24stündiger

[1]) *Carl Geyer*, Berlin N, Hessische Straße 8.

Bouillonkulturen schon so groß, daß die Ausbeute von Ein-Zell-Kulturen selbst bei Protokollierung zahlreicher Gesichtsfelder sehr dürftig werden kann; hier wird also zweckmäßiger von ganz jungen, eben sich trübenden Kulturen (5—6 Stunden alt) auszugehen sein, die unter vielen eingestellten Keimen keinen einzigen „Nuller" ergeben. Die widerstandsfähigeren *Streptokokken* bedürfen dieser Vorsichtsmaßregel nicht; ihr schnelles Wachstum auf Kochblutagar erlaubt die Abimpfung schon nach 6—8 Stunden Brutschranktemperatur. Eine andere Methode wieder gibt bei *Milzbrandbacillen* besonders große Ausbeute; die Wanne kommt sofort nach der Beschickung in den Brutschrank; nach 5—6 Stunden hat allenthalben das Wachstum der Kolonien begonnen; die jungen Kolonien tragen zahlreiche relativ lange Fortsätze, die sich unter dem Mikroskop oft genug als Einzelfäden erweisen; sie sind mit Capillaren leicht isoliert abzureißen und auf Platte oder Röhrchen zu verimpfen.

Diphtheriebacillen, aber auch die viel kleineren Hofmann-Stäbchen und Xerosebacillen brechen das Licht besonders stark; ihre relativ große Widerstandsfähigkeit drückt selbst bei Verwendung mehrtägiger Plattenkulturen als Ausgangsmaterials die Zahl der Versager auf ein Minimum herab.

Die Versuche wurden einstweilen mit der Ein-Zell-Kultur eines einzigen, gut giftigen Diphtheriestammes (Original, abgekürzt Or.) von typischer Morphologie angestellt. Noch nach mehrmonatiger Plattenpassage zeigt der Stamm bei der intracutanen Prüfung mit 24stündiger Löfflerkultur bei $^1/_{250}$ Öse kleine Nekrose, bei $^1/_{1000}$ Öse schwache Reaktion; subcutan tötet $^1/_{25}$ Öse nach 4 Tagen, $^1/_{50}$ Öse nach 10 Tagen mit typischem Befund; nach intratestikulärer Infektion, nach *Gins'* Vorschlag, stirbt das Meerschweinchen bei $^1/_{25}$ Öse nach 7, bei $^1/_{50}$ Öse nach 17 Tagen den Diphtherietod.

Kulturen auf Löfflerserum, üppig wachsend, zeigen die lange, schlanke Form mit ausgezeichneter Polkörperfärbung im Neisserpräparat. Auf Kochblutagar fällt zwar meist das Neisserbild dürftiger aus, dafür ist die Ausbildung besonders langer Formen neben kürzeren und die Entwicklung der Kolben ungewöhnlich schön (Tuschepräparat). 48stündige Kulturen zeigen starke Segmentierung bei Methylenblaufärbung. Das sorgfältig angefertigte Grampräparat bei 1 Minute langer Differenzierung unter dauernder Alkoholerneuerung mit der Träufelmethode nach *Deussen* läßt die Polkörper grampositiv, den Bacillenleib gramlabil erscheinen, so daß eine Art von Neisserbild zustande kommt.

Die Blutplatte zeigt die charakteristische Hämolyse; die weißliche Kolonie ist von einem sehr schmalen, scharfrandigen Aufhellungshof umsäumt, der auch nach mehrtägiger Bebrütung sich weder verbreitert noch diffus ausstrahlt. Die Traubenzucker-Kochblutplatte mit Lakmuszusatz (modifizierte Lingelsheimplatte) zeigt schon nach 24 Stunden Rötung, die nach 3 Tagen ihr Maximum erreicht. Ebenso wird Maltose vergoren, während Saccharose nicht angegriffen wird. 2 prom. Oleatagar nach *Engering*[1]) bleibt steril. Die Schüttelkultur in hoher Schicht von Kochblutagar wächst in allen Teilen der Agarsäule.

[1]) *Paul Engering* (Beuthen), Zur bakteriologischen Differenzierung der Diphtheriebacillen von den diphtherieähnlichen Stäbchen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **89**, 120. 1923.

I. Züchtung bei verschiedener Temperatur.

Die Versuche wurden begonnen, angeregt durch den Vortrag von *Gins* und *Fortner*[1]) in der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft, mit dem Studium des Temperatureinflusses auf die Morphologie der Diphtheriebacillen. Parallelabimpfungen auf Kochblutagar kamen teils auf 37°, teils auf 25°. Dabei zeigte sich bei allen Wiederholungen ein ganz gesetzmäßiges Verhalten. Die 37°-Kultur gibt die schon von *Gins* und *Fortner* geschilderten und abgebildeten langen, kolbigen Formen; die 25°-Platte dagegen enthält nach 24 Stunden ganz überwiegend kurze und kürzeste Stäbchen, bei zahlreichen Exemplaren von dem Kokkobacillentyp der Diphtheroiden. Erst im Laufe von Tagen wird das Bild immer pleomorpher; längere und kurze Formen in allen Übergängen werden gefunden. In mehrfacher Wiederholung wurden nun 24stündige 25°-Kulturen auf der Objektträgerwanne ausgespatelt und aus allerkürzesten Kokkobacillen Ein-Zell-Kulturen gewonnen. Und immer wieder ergaben diese Kulturen bei Parallelzüchtung auf 37° und auf 25° das gleiche Spiel; im Brutschrank die typischen langen und kolbigen Bacillen, bei Zimmertemperatur das Trugbild der Diphtheroiden.

Es läßt sich also zusammengefaßt sagen: Der Formenkreis des echten Diphtheriebacillus ist zwar ein anderer bei Züchtung auf 25° als auf 37°, die Kultur, die bei Zimmertemperatur gewachsen ist, kann zuerst im ganzen und nach mehreren Tagen wenigstens noch in großen Teilen eine Umwandlung in den Pseudotyp vortäuschen, aber niemals konnte eine solche Veränderung wirklich zur Konstanz und Unabhängigkeit vom Temperatureinfluß gebracht werden, auch nicht durch immer wiederholte isolierte Herauszüchtung der jeweils kürzesten Bakterienzellen.

II. Einfluß des Alterns von Agarkulturen.

Ebenso wenig Erfolg hatte ich mit dem Verfahren von *Bernhardt* und *Paneth*, durch Abimpfung von alternden Agarkulturen zur Abspaltung von Pseudodiphtheriekolonien zu gelangen. Sowohl Schrägröhrchen, die einen Monat lang bis kurz vor dem völligen Absterben dauernd im Brutschrank gestanden hatten, als auch solche Kulturen, die bei 25° fast 2 Monate am Leben zu erhalten waren, ergaben bei der Abimpfung ausnahmslos das charakteristische Wachstum der Diphtheriekolonien mit typischem Präparat. Auch *Bernhardt* betont, daß die Umwandlung in alten Kulturen keineswegs regelmäßig gelang; mit manchen Stämmen hatte er überhaupt nur negative Resultate.

---

[1]) *H. A. Gins* und *J. Fortner* (Institut „Robert Koch"), Beiträge zur Morphologie und Biologie der Diphtheriebacillen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **99**, 243. 1926.

III. Die Umwandlung im Reagensglase mit Kaninchennormalserum.

Die Umwandlung von echten Diphtheriebacillen in Diphtheroide in vitro war bisher nur *Bernhardt* und *Paneth* gelungen; auch hier bemerken die Autoren, daß die Umwandlung durchaus nicht regelmäßig auftrat. Daß die gleiche Versuchsanordnung mit Meerschweinchenserum weder in der Hand von *Schmitz*, noch bei *Gins* und *Fortner* zum Erfolge geführt hatte, bestärkte die Skepsis der Dualisten in bezug auf die Reinheit des Ausgangsmaterials bei *Bernhardt* und *Paneth*.

Ich ging von dem oben geschilderten Stamm Or. aus, nachdem er im Laufe meiner Temperaturversuche 5 mal Ein-Zell-Isolierungen passiert hatte. Ich betone, eine einzige Ein-Zell-Züchtung auf der Objektträgerwanne bietet jede Garantie der Gewinnung einer reinen Reihe; die fünfmalige Wiederholung stellte keine Maßnahme überflüssiger Sicherung dar, sondern lag in der Natur der geschilderten Temperaturexperimente.

Verwandt wurde 3 Tage altes Kaninchenserum, das aktiv zu je 0,5 ccm in Präzipitationsröhrchen gefüllt und mit massiver Einsaat beschickt wurde. In der ersten Serie stammte das Material von einer 4 Tage lang bei 25° gezüchteten Kochblutplatte. Die beimpften Röhrchen wurden unter verschiedenen Bedingungen gehalten, die eine Hälfte dauernd bei 37°, die andere bei 25°. Je ein Röhrchen wurde mit sterilem, flüssigem Paraffin, eins mit dem Vaselinsiegel anaerober Kulturen überschichtet, eins blieb unüberschichtet. Entsprechende Kontrollröhrchen wurden unbeimpft in der gleichen Weise gehalten.

Die ersten Aussaaten, und zwar stets mehrere Capillartropfen auf Kochblutagar, wurden nach 48 Stunden angelegt, die folgenden immer in Abständen von 24 Stunden. Nach 4 Tagen waren alle Aussaaten steril und blieben es bei allen späteren Nachuntersuchungen. Das Serum besaß also eine außerordentlich starke bakterizide Kraft.

Die bei 25° gehaltenen Röhrchen ergaben nach 48 Stunden noch eine üppige Ausbeute unveränderter Diphtheriekolonien, bis auf das vaselingesiegelte Röhrchen, das jetzt bereits völlig sterilisiert war. Nach 3 Tagen erwiesen sich auch die anderen Röhrchen als steril. Hier mißlang die Gewinnung irgendwie veränderter Keime.

Ganz anders bei den im Brutschrank gehaltenen Serumröhrchen. Röhrchen Nr. 1 ist nicht überschichtet, Nr. 2 paraffinüberschichtet, Nr. 3 vaselingesiegelt.

Erste Aussaat nach 48 Stunden:

Nach 24stündiger Bebrütung der Aussaatplatte sind bei 1 nur 6 typische Diphtheriekolonien gewachsen, 2 und 3 sind steril; nach weiterer Bebrütung erscheinen am zweiten Tage bei 1 noch 2 kleine, hellere Kolonien, bei 2 eine größere und 3 kleine, im ganzen 4 Kolonien, bei 3 schließlich 2 kleine Kolonien. Da die eine kleine Kolonie aus Röhrchen 1 bei

der ersten Abimpfung sich bereits in 2 verschiedene Koloniearten spaltete, beträgt die Gesamtausbeute dieser ersten Aussaat der 48 Stunden alten Serumröhrchen 9 veränderte Stämme, 3 aus Röhrchen 1, 4 aus Röhrchen 2, 2 aus Röhrchen 3. Dazu kommt noch ein 10. Stamm aus der 2. Aussaat nach 3 Tagen. Diesmal ist die Platte nach 24 Stunden völlig steril und bleibt es bei Röhrchen 2 und 3 auch weiterhin, während bei 1 noch eine einzige kleine, hellere Kolonie nachwächst.

Abimpfungen auf verschiedene Nährböden, Präparate mit Methylenblau, Neisser, Tusche, nach Gram ergeben das folgende Resultat:

Alle 10 Stämme erweisen sich in jeder Beziehung als Repräsentanten der Diphtheroidgruppe. Zwei Hauptgruppen lassen sich abgrenzen, innerhalb deren Unterschiede der einzelnen Stämme zwar deutlich, aber unerheblich sind.

Gruppe A: *Hofmann-Typ.* Auf allen Nährböden üppig wachsend, die meisten Stämme gut verreibbar, ein Stamm stark klumpend, zeigen die Kulturen im Präparat die monomorphe, gedrungene, etwas eiförmige Kurzstäbchenform ohne Kolben mit mehr oder weniger deutlichen Polkörpern und intensiver gleichmäßiger Gramfärbung.

Gruppe B: *Xerosetyp.* Auf Löfflerserum wesentlich dürftiger als Diphtherie, in flachen Kolonien mit gezacktem Rand, auf Kochblut- und gewöhnlicher Blutmischplatte ungemein zart in winzigen Kolonien wachsend zeigen die Kulturen im Präparat die fast kokkenartig kurzen, manchmal an einem Ende keilartig verdickten, fast völlig polkörperfreien, stark grampositiven Formen, die als Xerosebacillen bezeichnet werden.

Bemerkenswert erscheint mir die Beobachtung, daß die Bacillen vom Xerosetyp offenbar Resultat einer weitergehenden Schädigung durch das Serum sind als die Hofmannbacillen; die erste Aussaat des nicht überschichteten Röhrchens, die einzige, die noch echte, unveränderte und vollgiftige Diphtheriebacillen ergibt, liefert daneben 3 Hofmannstämme, während nach weiteren 24 Stunden der einzige nun noch angehende Keim ein Xerosestäbchen ist. Das Paraffinröhrchen, bei dem der unvollständige Sauerstoffabschluß die Sterilisierung begünstigt, ergibt einen bacillären Stamm neben 3 Xerosestämmen. Das durch Vaselin völlig luftdicht abgeschlossene Röhrchen, das auch in der 25°-Reihe als erstes komplette Abtötung zeigt, spendet gar keine Hofmannbacillen, sondern nur noch Xerosestäbchen. Damit ist natürlich keineswegs gesagt, daß die Umwandlung von Diphtherie zur Xerose das Stadium des Hofmann-Typs passieren muß. Viel näherliegend erscheint mir die Annahme, daß je nach der Widerstandsfähigkeit der einzelnen Diphtheriebacillen gegenüber der Schädigung der Absterbeprozeß in drei Hauptreihen verläuft, wie das unter Berücksichtigung des Zeitmomentes folgendes Schema veranschaulicht:

I. Diphtherie ——→ †
II. Diphtherie ——→ Hofmann
III. Diphtherie ————→ Xerose.

Die Lösung dieser Frage dürfte experimenteller Bearbeitung zugänglich sein; die Beziehungen von Hofmann- und Xerosetyp zu einander, studiert wieder an Ein-Zell-Kulturen unter Einfluß schädigender oder wachstumsfördernder Momente, wäre eins der nächsten Probleme.

Wie auch die älteren Autoren meist bemerkt haben, erschienen auch bei mir die Primärkolonien der Diphtheroide erst nach 48stündiger Bebrütung auf den Platten; dagegen gehen alle Subkulturen, von der ersten Abimpfung an, stets schon nach 24 Stunden an; doch dokumentiert sich das verlangsamte Wachstum selbst der zu üppigem Rasen auskeimenden Hofmannbacillen auch später noch bei Züchtung auf 25°, bei der alle Diphtheroiden erst nach mehreren Tagen erscheinen, während die Diphtheriebacillen immer schon nach 24 Stunden gut gewachsen sind.

Eine Wiederholung des Umzüchtungsexperimentes im gleichen Kaninchenserum, aber 13 Tage nach der Entblutung und nach Inaktivierung, zeigte wieder den starken bakteriziden Effekt des Serums. Nach 3 Tagen schienen alle Röhrchen, die diesmal mit massiver Einsaat von 24stündiger Löfflerplatte beschickt waren, völlig steril, ohne daß die Herauszüchtung veränderter Stämme geglückt war. Eine Nachuntersuchung nach 16tägiger Bebrütung lieferte jedoch aus dem Röhrchen 1 (nicht überschichtet) noch eine einzige voll toxische Diphtheriekolonie, aus dem Röhrchen 2 (Paraffin) eine einzige Kolonie vom Xerosetyp. Dieser dürftige Erfolg beweist also wenigstens, daß prinzipiell kein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Serum, zwischen Einsaat junger und älterer Kulturen besteht.

Bereits oben bei der Schilderung der beiden Hauptgruppen wurde erwähnt, daß die einzelnen Stämme innerhalb jeder Gruppe keineswegs alle in Wuchsform und Morphologie übereinstimmen; sowohl in der Länge der Bacillen wie in dem Grade der Monomorphie und in der Ausbildung oder dem Fehlen der Polkörper, sowohl in dem Charakter der Kolonien, wie in Hämolyse und Zuckervergärung zeigen die einzelnen Stämme Unterschiede, die bei der Weiterzüchtung einstweilen in ca. 25 Plattenpassagen ziemlich konstant festgehalten wurden.

Fast allen isolierten Diphtheroidstämmen gemeinsam sind die Eigenschaften, die für die Pseudodiphtheriebacillen überhaupt als charakteristisch gelten, mit einigen ganz interessanten Abweichungen. Zum Vergleich wurde nicht nur der Ausgangsstamm, sondern auch 2 von den 6 aus dem aktiven Serumröhrchen 1 angegangenen unveränderten Diphtheriestämmen und der nach 16 Tagen aus dem inaktiven Serumröhrchen 1 noch zurückgewonnene Diphtheriestamm mitgeprüft.

1. *Toxizität:*

a) Meerschweinchen subcutan infiziert mit 2 Ösen 24stündiger Löfflerkultur, in Bouillon aufgeschwemmt: alle 10 Stämme werden reaktionslos vertragen.

b) Intracutan, $^1/_{10}$ Öse: Nur ein Hofmannstamm (3) aus Röhrchen 1 zeigt eine angedeutete Reaktion ohne Nekrose, alle anderen bleiben komplett negativ. Die 3 Diphtheriestämme ergeben markstückgroße Nekrosen.

2. *Anaerobiose:*

In Schüttelkulturen von Kochblutagar wachsen alle geprüften Stämme nur wenige Millimeter bis 1 cm tief unter der Oberfläche der hoch gefüllten Röhrchen; die 3 Diphtheriestämme wachsen bis zum Boden der Röhrchen.

3. *Hämolyse* auf der Blutplatte:

Im Gegensatz zu den Diphtheriestämmen, die den scharfrandigen, schmalen, hämolytischen Hof schon nach 24 Stunden zeigen und unverändert behalten, verändern die Diphtheroidstämme den Nährboden nicht im geringsten, wieder mit der Ausnahme des Hofmannstammes 3, der nach mehrtägiger Bebrütung diffuse Aufhellung hervorruft (Späthämolyse).

4. *Säurebildung,* geprüft auf modifizierten Lingelsheimplatten aus Kochblutagar mit je 1% Dextrose, Maltose, Saccharose:

Die Diphtheriestämme geben Rötung der Dextrose- und Maltoseplatte und lassen die Saccharoseplatte unverändert. Die Xerosestämme, übrigens in völliger Übereinstimmung mit 8 Kontrollstämmen, von denen 7 aus Urethra oder Prostataexprimat, 1 aus einem Gerstenkorn isoliert wurden, vergären keine der drei geprüften Zuckerarten; nur der aus Röhrchen 2 des inaktiven Serums nach 16 Tagen wiedergewonnene Stamm rötet alle drei Platten intensiv. Von den 4 Stämmen des Hofmann-Typs vergärt einer (wieder Nr. 3) Dextrose und Maltose wie Diphtherie, dagegen Saccharose besonders intensiv; einer Dextrose gut, Maltose und Saccharose erst nach 3 Tagen minimal; zwei lassen alle drei Platten völlig (Dextrose und Maltose) oder fast völlig (Saccharose) unverändert.

5. *Oleatagar* (*Engering*):

Die Diphtheriestämme bleiben steril. Alle Pseudokulturen bis auf eine einzige vom Xerosetyp wachsen gut oder sogar besonders üppig, wieder in Übereinstimmung mit den Genital- und Augenstämmen.

Allen Stämmen gemeinsam ist in Übereinstimmung mit Diphtherie die charakteristische Palisadenlagerung im Präparat und im Gegensatz zu den gramlabilen Löfflerbacillen die intensive Grampositivität.

Es erscheint mir bemerkenswert, daß eine Wiederholung des Umwandlungsversuches im Reagensglase mit einem anderen Kaninchenserum einstweilen ganz andere Resultate ergab. Ein 10 Tage altes Normalserum, aktiv und inaktiv, mit Vaselin gesiegelt, mit flüssigem Paraffin überschichtet und unüberschichtet, zeigte in allen Röhrchen, die dauernd im Brutschrank gehalten wurden, bei häufigen Aussaaten durch bisher 2 Monate nicht die geringste Abtötung und keinerlei Veränderung der überall reichlich angehenden Kolonien. Dies Ergebnis bestätigt die Beziehung von bactericider Wirkung des Serums und der Entstehung veränderter Stämme.

Die Frage, von welchen Einflüssen die fundamental verschiedene Wirkung mehrerer Seren abhängig ist, unter Berücksichtigung der Verhältnisse bei Verwendung von menschlichem Serum, wird Gegenstand weiterer Untersuchung sein müssen.

IV. Tierversuche.

Wie in der Einleitung ausgeführt, wurde auf das Studium der Umwandlung im Meerschweinchenkörper kein sonderlicher Wert gelegt. Und so soll hier nur in Kürze über eine kleine Reihe von Tieren berichtet werden, die zur genauen Giftbestimmung des Ausgangsstammes intracutan, subcutan, intratestikulär infiziert und genauer bakteriologischer Untersuchung unterworfen wurden. Bis auf ein Tier, das 17 Tage nach intratestikulärer Infektion ($^1/_{50}$ Öse) starb und durch Überwucherung der Platten mit Proteus ausfiel, lieferten alle anderen Tiere, wenn auch in geringer oder minimaler Ausbeute, Diphtheroide. Auch hier erschienen, im Gegensatz zu den Diphtheriekolonien, die Pseudostämme fast immer erst nach 48stündiger Bebrütung der Kochblutplatten.

Die Ausbeute an unveränderten Diphtheriebacillen und an Pseudodiphtheriebacillen zeigt die folgende Zusammenstellung, in der H Diphtheroide der Hofmanngruppe, X solche der Xerosegruppe bedeutet:

1. Intracutan (Nr. 401). 6 Injektionen von $^1/_{25}$ bis $^1/_{2500}$ Öse. Typischer Diphtherietod am 3. Tag. Aussaaten: Subcutis unter nekrotischer Impfstelle, Cutis an nekrotischer Impfstelle, Peritoneum, Milz, Pleura, Perikard, Herzblut, Nebenniere, Niere.

Diphtherie	*Pseudodiphtherie*	viel Saprophyten
überall negativ	Milz: 1 Kol. (schlanke, gekrümmte Bacillen)	

2. Subcutan $^1/_{25}$ Öse (Nr. 408). Typischer Diphtherietod am 4. Tag. Aussaaten: Ödem an Impfstelle, Ödem weit von Impfstelle entfernt, Peritoneum, Milz, Pleuraexsudat, Herzblut, Nebenniere, Niere.

Diphtherie	*Pseudodiphtherie*	sonst steril,
Impfstelle ++++	Pleura: 1 Kol. (H)	aus Herzblut:
entferntes Ödem: 2 Kol.		Streptothrichee +++
Pleura: 6 Kol.		

3. Subcutan $^1/_{50}$ Öse (Nr. 403). Typischer Diphtherietod am 10. Tage. Aussaaten: Impfstelle, Milz, Pleura, Perikard, Herzblut, Nebenniere, Niere.

Diphtherie	*Pseudodiphtherie*	sonst steril,
Impfstelle: ++	Perikard: 1 Kol (X)	nur Milz: Saprophyt aus
Perikard: +	Nebenniere: 1 Kol. (H mit Späthämolyse auf Blutplatte)	der Friedländer-Gruppe.

4. Intratestikulär $^1/_{25}$ Öse (Nr. 406). Typischer Diphtherietod am 7. Tage. Aussaaten: Milz, Pleuraexsudat, Herzblut, Nebenniere, Niere, infizierter Hoden.

Diphtherie	*Pseudodiphtherie*	sonst steril.
Hoden: ++++	Hoden: 2 Kol. (X)	

Zusammenfassung und Besprechung.

Ein einfaches und zuverlässiges Ein-Zell-Kulturverfahren, das sich auch bei schwer verreibbaren Bakterien ausgezeichnet bewährt, wird geschildert. Die Züchtung von Diphtheriebacillen in reiner Reihe bei

Zimmertemperatur ergibt ein morphologisches Bild der Keime, das stark an Pseudodiphtherie erinnert, doch führt selbst die Isolierung kürzester Zellen niemals zur Gewinnung umgewandelter Stämme: bei Züchtung im Brutschrank wachsen die Bacillen sogleich wieder in typischer Form.

Dagegen glückt es, aus unverdünntem Kaninchenserum nach massiver Beimpfung mit echten, hochgiftigen Diphtheriebacillen kurz vor der Abtötung der Einsaat, die nach wenigen Tagen eintritt, zur Abspaltung umgewandelter Stämme zu gelangen, die in jeder Richtung, in Morphologie und Färbung, in Kultur und Biochemie, und im Tierversuch alle charakteristischen Merkmale der atoxischen Diphtheroide, entweder vom Hofmann-Typ oder vom Xerosetyp zeigen; dabei scheint die Entstehung der Xerosestämme die Folge einer intensiveren Schädigung zu sein als die der Hofmannbacillen. Entsprechende Umwandlungsformen wurden im Tierkörper nach intracutaner, subcutaner und intratestikulärer Infektion erzielt.

Der Reagensglasversuch mit Ein-Zell-Kulturen erbringt, wohl zum ersten Male, den eindeutigen Beweis, daß sich echte toxische Diphtheriebacillen in typische Diphtheroide, sowohl in Hofmannbacillen wie in Xerosestäbchen, umwandeln können. Und diese strikte Beweisführung gibt auch den Tierexperimenten, den älteren wie den hier mitgeteilten, eine Dignität, die ihnen bisher bestritten werden konnte; die nach der Infektion mit dem Krankheitserreger aus dem Tierkörper wiedergewonnenen Diphtheroide sind Varianten des giftigen Ausgangsmaterials. Und weiter erfahren so die alten Schlüsse aus kasuistischen Beobachtungen eine Stütze, daß auch im kranken Menschen die gleiche Umwandlung vor sich gehen kann.

Damit erweitert sich die Frage zu einem umfassenderen Problem: in welchen Beziehungen stehen überhaupt die bei Mensch und Tier weit verbreiteten saprophytären Diphtheroide zum Bacillus diphtheriae? Zunächst gäbe es zwei Möglichkeiten. Einmal könnte man annehmen, daß diese Saprophyten zum Teil zwar von echten Diphtheriebacillen abstammen, andererseits aber eine eigene, in allen ihren Merkmalen nur *zufällig* mit den Diphtherievarianten übereinstimmende Bakterienart darstellen. Schon das Moment dieser zufälligen Übereinstimmung diskreditiert diese Hypothese solange, wie nicht zwingende Gründe ihre Unabweisbarkeit fundieren. Der Hinweis auf die quantitativen Verhältnisse ist solch ein zwingender Grund gewiß nicht. Denn es liegt im Wesen der Pathogenität begründet, daß ein Krankheitskeim, der ja seine Reizwirkung nicht einseitig auf den Wirt entfaltet, sondern seinerseits vom kranken, d. h. zur Heilung bereiten Wirt abgewehrt wird, zugrunde geht. Nur ein winziger Bruchteil der pathogenen Population entgeht diesem Untergang durch Rettung in neue Wirte, durch fortgesetzte Infektionen. Entstehen dagegen bei Vermehrung im Kranken

apathogene Varianten, so ändern sich für diese mit einem Schlage die Existenzbedingungen; sie stehen in keiner Wechselwirkung mit ihrem Träger, dessen Abwehrkräfte gegen ihre pathogenen Ahnen an ihnen vorbeischießen, der gegen sie selbst Immunstoffe zu bilden keinen Anreiz erfährt. Sie siedeln sich an, sie vermehren sich unbehelligt, sie werden übertragen, kurz sie schmarotzen. Selbst wenn sich diese Umwandlung nur bei einem kleinen Bruchteil der Kranken vollzieht, muß so im Laufe der Jahrtausende die denkbar größte numerische Verschiebung zustande kommen: auf der einen Seite die begrenzte Menge des Krankheitserregers, auf der anderen Seite die Legion des schier ubiquitären Saprophyten.

Und so lautet die zweite Hypothese: *alle* bei Mensch und Tier saprophytären Diphtheroide stammen letzter Linie von echten Diphtheriebacillen ab.

Aber noch eine dritte Möglichkeit — oft ausgesprochen — bleibt zu diskutieren, nämlich daß gerade umgekehrt der Saprophyt die primäre Bakterienart darstellt, aus der sich der pathogene Keim als Variante unter besonderen Bedingungen erhebt oder einmal erhoben hat. Es kann kaum geleugnet werden, daß für viele Infektionskrankheiten diese Annahme ihre experimentellen Unterlagen hat. Freilich sind die landläufigen Verfahren der „Hochzüchtung" eines avirulenten Laboratoriumsstammes durch Tierpassage irrelevant, solange nicht durch Ein-Zell-Kultur des avirulenten Ausgangsmaterials der Beweis der reinen Reihe erbracht ist, solange also die „Steigerung der Virulenz" durch Herauszüchtung aus einem Gemisch, durch einfache Selektion vorgetäuscht werden kann. Aber auch heute schon gibt es genug der einwandfreien Beobachtungen, die eine Plusvariation hinsichtlich der Virulenz beweisen. Es wird Gelegenheit sein, darauf in anderem Zusammenhang zurückzukommen. Hier genüge der Hinweis auf das Virus fixe bei Lyssa.

Aber sicher ist, daß eine solche Plusvariation im Kapitel Diphtherie noch niemals beobachtet werden konnte. Nicht einmal der aus echten Diphtheriebacillen künstlich gewonnene atoxische Variant, die experimentelle Minusvariation also, kann die Fähigkeit seines Ascendenten wiedergewinnen. Das bestätigt erst neuerdings wieder *Crowell*[1]) in einer mir erst nach Abschluß meiner Untersuchungen bekannt gewordenen Arbeit. Der amerikanische Autor, der einzige, der meines Wissens bisher mit Ein-Zell-Kulturen vom Diphtheriebacillus, und zwar nach der Methode *Ørskow*, gearbeitet hat, konnte aus einer reinen Reihe hochgiftiger Löfflerbacillen eine atoxische Variante abspalten, deren

[1]) *Minot J. Crowell* (Brown University), Morphological and physiological variations in the descendants of a single Diphtheria bacillus. Journ. of Bacteriolog. **9**, 65. 1926.

morphologische Unterschiede vom Mutterstamm nur inkonstant waren, deren Atoxizität aber durch keine Maßnahme mehr verändert werden konnte. So gibt es einstweilen keine wissenschaftliche Grundlage für die Hypothese, daß der echte Diphtheriebacillus vom apathogenen Diphtheroidsaprophyten abstammt.

Am plausibelsten erscheint also die Annahme, die im Erreger der menschlichen Diphtherie die primäre Species sieht, aus der durch Umwandlung die saprophytären Pseudodiphtheriebacillen als Minusvarianten hervorgegangen sind. Damit bleibt noch ungelöst die Frage, wo kommt dieser Krankheitskeim und damit die Krankheit selbst her? Dies Problem bleibt gewiß einstweilen nur spekulativer Betrachtung zugänglich; doch könnte es auch wissenschaftlicher Forschung durchaus erreichbar werden.

Der Versuch, die Entstehung der Diphtherie aus stammverwandten Saprophyten abzuleiten, findet, wie ausgeführt, keine Unterlage in den Tatsachen der Forschung, die bis heute vorliegen. Nichts steht aber dem im Wege, die *Umwandlung zum Krankheitserreger nicht*, wie bisher, *im Parasiten, sondern im Wirt* zu suchen. Der echte Bacillus Löffler wäre danach Saprophyt seiner Träger gewesen, bis er auf einer empfänglichen oder empfänglich gewordenen Art oder Rasse zum ersten Male Gelegenheit gefunden hätte, seine pathogenen Fähigkeiten am geeigneten Objekt zu entfalten.

(Eingegangen am 7. Juli 1926).

(Aus dem Institut „Robert Koch“ Berlin.)

Die Wirkung des Sanocrysins auf die Tuberkulose im Tierexperiment.

Von
Prof. **Bruno Lange** und Dr. **Adolf Feldt.**

Die Versuche, *Goldpräparate zur Behandlung der Tuberkulose* zu verwenden, begannen im Jahre 1913. *Bruck* und *Glück* und, unabhängig von ihnen, *Feldt* waren von der Angabe *Robert Kochs* (1890) ausgegangen, daß *Goldcyanid* (wohl Goldcaliumcyanür) eine alle andere von ihm untersuchten Substanzen übertreffende Entwicklungshemmung auf Tuberkelbacillenkulturen ausübt. *Bruck* und *Glück* überzeugten sich im Kaninchenversuch von der relativen Ungiftigkeit des Goldkaliumcyanids und behandelten damit intravenös an Lupus vulgaris, aber auch an Syphilis erkrankte Menschen. Nach annähernd zweijähriger ausgedehnter Nachprüfung an zahlreichen in- und ausländischen Kliniken wurde das Präparat allgemein wieder fallen gelassen. Das Endurteil lautete dahin, daß in vielen Fällen von Hauttuberkulose wohl entzündliche Herdreaktionen nach Aurum-Kalium cyanatum beobachtet wurden, eine Heilwirkung sich jedoch nur selten und unvollkommen nachweisen läßt. *Feldt* berichtete (1913) in seiner Arbeit zur Chemotherapie der Tuberkulose mit Gold über Versuche das Goldcyanid durch chemische Kuppelung mit Cantharidinderivaten zu entgiften und dadurch therapeutisch verwertbar zu gestalten. Tierversuche schienen dafür zu sprechen, daß eine verzögernde Wirkung auf den Tuberkuloseablauf möglich sei. *Spiess* und *Feldt* stellten daraufhin mit Aurocantan, dem Doppelsalz von Goldcyan und entgiftetem Cantharidin, klinische Versuche an Tuberkulösen an, die zu einem günstigen Resultate besonders in der Behandlung der Kehlkopftuberkulose führten. Die unvollständig, ohne Versuchsprotokolle veröffentlichten Tierversuche von *Feldt* konnten dagegen von *Geinitz* und *Unger-Laisle* und von *De Witt, Cadwell* und *Leavell* nicht bestätigt werden. Seit 1916 wurden mit dem von *Feldt* dargestellten und in die Therapie eingeführten ersten organischen Goldpräparat *Krysolgan* ausgedehnte klinische Versuche angestellt. Das Urteil maßgeblicher in- und ausländischer Fachärzte läßt sich jetzt dahin zusammenfassen, daß *Krysolgan* bei *bestimmten Fällen* von Tuberkulose aller Organlokalisationen einen unzweifelhaft die Heilung fördernden Einfluß ausübt.

Als ein Mangel der bisherigen Goldbehandlung der Tuberkulose, insbesondere mit Krysolgan, wurde es empfunden, daß sie sich nicht auf positive Tierversuche stützte.

Ende des Jahres 1924 erschien das Buch von *Holger Möllgaard* „Chemotherapy of Tuberculosis". Auch *Möllgaard* ging von der Beobachtung *Kochs* über Goldcyanid aus. Auf Grund theoretischer Erwägungen und chemisch-physikalischer Vorversuche wählte er unter verschiedenen Goldpräparaten das Natriumaurothiosulfat (dargestellt im Jahre 1845), zu dessen Herstellung er ein verbessertes chemisches Verfahren fand, und nannte es Sanocrysin. Bereits *Feldt* (1913) hatte mit Natriumaurothiosulfat experimentiert und darauf hingewiesen, daß das Gold in diesem Präparat an einen gänzlich ungiftigen Stoff gebunden sei. Aus den Tierversuchen, in denen tuberkulöse Meerschweinchen und Kaninchen 24 Stunden nach subcutaner und intravenöser Einverleibung des Goldpräparates eine durch ihre Intensität häufig überraschende Herdreaktion zeigen, hatte *Feldt* zuerst den Schluß gezogen, daß zum mindesten in den peripheren Schichten der Tuberkel die Bacillen abgetötet werden und daß durch die dadurch freiwerdenden Bacillentoxine eine „sekundäre Tuberkulinreaktion" ausgelöst wird. Spätere Versuche haben ihn dann zu der Annahme geführt, daß die Wirkung des Goldes im tuberkulösen Organismus nicht in einer direkten Wirkung auf den Erreger, sondern auf das kranke Gewebe und den Gesamtorganismus besteht.

Möllgaard glaubt in dem Sanocrysin ein Goldpräparat gefunden zu haben, das dank seiner ausgesprochenen Bacteriotropie und seiner mangelnden Organotropie im infizierten Tierkörper eine direkte bactericide Wirkung auf den Tuberkelbacillus ausübt. Das Mittel besitzt nach ihm die als Postulate a priori aufgestellten Eigenschaften, nämlich wasserlöslich zu sein, durch tierische Membranen schnell zu diffundieren, es ist komplex gebunden und gibt daher in Lösung nicht die Reaktionen des Goldions, es wird endlich im Organismus nur langsam zersetzt ohne giftige Zersetzungsprodukte zu bilden.

Den Anspruch, in dem Sanocrysin ein chemotherapeutisches Mittel gegen Tuberkulose zu besitzen, gründet *Möllgaard* auf Versuche an großen Tieren (Rindern); die Nachprüfung und kritische Besprechung dieser Versuche bildet den wesentlichsten Teil unserer Arbeit. Zunächst seien jedoch einige Versuche über die Wirkung des Mittels in vitro sowie auf kleine Tiere mitgeteilt.

Wirkung von Sanocrysin in vitro.

Die entwicklungshemmende Wirkung des Sanocrysins auf Tuberkelbacillenkulturen reicht nach *Möllgaard* bis zu einer Verdünnung von 1 : 100000. Nachdrücklich weist er darauf hin, daß eine auch *vollständige Entwicklungshemmung* nicht gleichbedeutend ist mit *bactericider Wirkung.*

Die in ihrer Entwicklung gehemmten Kulturen können für Meerschweinchen noch infektiös sein. Die Angaben über Entwicklungshemmung des Sanocrysins sind von verschiedenen Seiten nachgeprüft und erweitert worden. *Oluf Bang* und besonders *Madsen* haben gezeigt, daß verschiedene Tuberkelbacillenstämme sich in dieser Beziehung verschieden verhalten können. *Madsen* fand, daß frisch aus menschlichem tuberkulösem Material gezüchtete Stämme bis zu 1 : 100 000 gehemmt werden können, während er einen alten Laboratoriumsstamm wesentlich resistenter fand, da er erst bei 1 : 25 (!) in seinem Wachstum gehemmt wurde. Auch derselbe Stamm zeigte in verschiedenen Versuchen eine verschiedene Resistenz. Wir haben die Entwicklungshemmung von Sanocrysin in Glycerinbouillon und in Asparaginnährboden geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Entwicklungshemmung durch Sanocrysin.*

Nährboden	Stamm L bov.	Stamm G. A. bov.	Typ. gallinaceus	Grasbacillen
Glycerinbouillon . .	1: 10 000bis 1: 50 000	1: 50 000 bis 1: 100 000	1 : 5000	1 : 5000
Asparaginnährboden		1 : 10 000		nach 5 T.: 1 : 10 000 nach 9 T.: 1 : 100000

Der Stamm *L* von *Möllgaard* wuchs auf unserer Glycerinbouillon anfangs sehr langsam und wurde durch Sanocrysin bis 1 : 50 000 gehemmt. Nach mehreren Monaten hatte er sich an den Nährboden angepaßt und zeigte bereits nach 5 Tagen gutes Wachstum; jetzt wurde er durch Sanocrysin erst bei 1 : 10 000, und zwar nicht vollständig gehemmt. Die Ergebnisse sind, wie auch *Madsen* angibt, bei demselben Stamm zu verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Stämmen stark abweichend. Ein Grund für dieses abweichende Verhalten eines und desselben Stammes ist, wie erwähnt, die Anpassung an den Nährboden. Ein weiterer Grund liegt in der ungleichen Reaktion der Nährböden.

Auch die *abtötende* Wirkung von Sanocrysin auf Tuberkelbacillen in vitro haben wir geprüft. Wir wählten eine Sanocrysinkonzentration von 1 : 1000. Um hier auch geringe Wirkungen zu erkennen, haben wir nach bestimmter Einwirkungszeit des Mittels gleiche Mengen des Bacillensanocrysingemisches auf Lubenausche Eiernährböden (2—3 Röhrchen) verbracht und einem Meerschweinchen eingeimpft. Hierdurch konnten wir bis zu einem gewissen Grade eine Vorstellung über die *quantitativen Verhältnisse* bei der Desinfektion und über etwa zustandekommende *Virulenzschädigungen* gewinnen.

Bei der großen wie bei der kleinen Einsaat von Tuberkelbacillen vermochte die 1‰ Sanocrysinlösung eine Abtötung sämtlicher Keime der Einsaat nicht einmal nach 24 Stunden herbeizuführen. Nur die Zahl der

Tabelle 2. *Wirkung einer 1 prom. Sanocrysinlösung auf Tuberkelbacillen in vitro. (Stamm hum. Betge.)*

Prüfung des Desinfektionserfolges durch Verimpfung gleicher Bacillenmengen auf Kultur und Tier.

	Wann Aussaat aus dem Bacillen-sanocrysingemisch?	Größe der Aussaat in mg T.-B. (enthalt. in 0,04 ccm)	Zahl der Kolonien auf Eierröhrchen	Ergebnis der Meerschweinchen-impfung
Kontrolle: 0.00025 mg. T.-B. in 1 ccm Kochsalzlösung	—	0,00001	R. 1 = 4 R. 2 = 0 R. 3 = 0	
		0,0000001	—	M. 1 = + M. 2 = 0
2.5 mg T.-B. in 1 ccm 1prom. Sanocrysin	Sofort	0,1	R. 1, R. 2 ∞	
	1 Std.		R. 1, R. 2 +	
	3 Std.		R. 1, R. 2 + + +	
	24 Std.		R. 1, R. 2 + +	M. = +
0,0025 mg. T.-B. in 1 ccm 1prom. Sanocrysin	Sofort	0,0001	R. 1 = 14 R. 2 = 33	
	1 Std.		R. 1 = 3 R. 2 = 10	M. = +
	3 Std.		R. 1 = 20 R. 2 = 7	M. = +
	24 Std.		R. 1 = 1 R. 2 = 0	M. = +

Bemerkungen: Kulturwachstum + = mäßig reichlich Kol.
+ + = zahlreiche Kol.
+ + + = sehr zahlreiche Kol.
∞ = ganze Schrägfläche bewachsen.

Bacillenaufschwemmung und Sanocrysinlösung in Aq. dest.

in künstlicher Kultur auskeimenden Bacillen ist durch Absterben bzw. starke Schädigung eines Teils derselben verringert worden. Merkwürdigerweise tritt diese Abnahme der Zahl an lebenden Keimen bei der großen Einsaat und Aussaat viel stärker hervor. Vielleicht ist hier mehr Sanocrysin in der Kultur freigeworden, das nachträglich entwicklungshemmend gewirkt hat, es werden ja 1000 mal mehr Bacillen wohl auch eine entsprechend größere Sanocrysinmenge binden (Adsorption?). Bei der kleinen Einsaat ist lediglich bei Entnahme nach 24 Stunden ein Erfolg insofern angedeutet, als nur $^1/_{10}$ der eingesäten Keime noch lebensfähig ist. Wäre eine Beeinflussung der Keime überhaupt nicht erfolgt, hätten entsprechend der Kontrolle pro Röhrchen 4 × 10 : 3 also 13 Kolo-

nien auswachsen müssen. Eine Virulenzschädigung der Keime konnte bei der Verimpfung der Bacillen nach der Sanocrysinwirkung auf Meerschweinchen nicht nachgewiesen werden. Die Tiere erkrankten sämtlich an generalisierter Tuberkulose.

Versuche an Meerschweinchen und Kaninchen.

Möllgaard prüfte zunächst, ob tuberkuloseinfizierte Meerschweinchen durch Sanocrysin vor Ausbreitung der Infektion (Generalisierung) geschützt werden können. Meerschweinchen wurden subcutan mit Tuberkelbacillen infiziert und sofort nachher an der Stelle der Infektion 0,01 bis 0,02 g Sanocrysin injiziert. In Intervallen von 4—6 Tagen wurde die Sanocrysininjektion 3—4 mal wiederholt. Sowohl die behandelten wie die Kontrolltiere wurden nach 15 bzw. 25 Tagen getötet. Die 5 Kontrolltiere zeigten beginnende generalisierte Tuberkulose, während 4 von 5 mit Sanocrysin behandelten Tiere keine Spur von Tuberkulose der Lymphdrüsen und Organe zeigten. Wir haben einige Meerschweinchen in ähnlicher Weise infiziert und behandelt, jedoch am Leben gelassen; dabei sahen wir keinen Einfluß der Behandlung auf das Auftreten der Drüsenschwellung und den weiteren Verlauf.

Obwohl *Möllgaard* selbst keine Versuche über Allgemeinbehandlung mit Sanocrysin an kleinen Tieren mitgeteilt hat, schien es uns doch von Interesse, einige Versuche in dieser Richtung anzustellen. Wir prüften daher die Wirkung von *Sanocrysin auf den Ablauf der Tuberkulose bei Meerschweinchen* unter Variation der infizierenden Dosis der Kultur sowie der Dosierung des Mittels und zwar unter möglichst einfachen Versuchsbedingungen, indem sowohl die Infektion, als auch die Behandlung intraperitoneal erfolgten. 5 Tiere wurden mit 50 mg Kultur infiziert, 1 davon diente als Kontrolle. 2 Tiere erhielten die Infektionsdosis gemischt mit 0,015 g Sanocrysin, 2 Tiere dieselbe Sanocrysindosis einige Minuten nach erfolgter Infektion. 12 weitere Meerschweinchen, darunter 2 Kontrolltiere, wurden mit $^1/_{10\,000}$ mg Kultur infiziert. Je 2 Tiere bekamen 0,015 g Sanocrysin gemischt mit der Infektionsmenge, je 2 bald darauf, je 2 nach 4 Tagen, 10 Tagen, 3 Wochen. (Volumen Bacillenaufschwemmung und Sanocrysin je 0,5 ccm.) Die Sanocrysininjektion wurde in ca. 4tägigen Intervallen bis zu 15 mal wiederholt.

Die Tabelle 3 zeigt, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Heilwirkung des Sanocrysins auf die tuberkulöse Infektion des Meerschweinchens nicht nachweisbar war.

Beachtenswert erscheint die verschiedene Toxizität des Mittels bei normalen und infizierten Meerschweinchen. Es zeigen sich nicht nur entsprechend den Beobachtungen *Möllgaards* an Rindern die infizierten Tiere weit empfindlicher als die Kontrolltiere, sondern auch die stark infizierten Tiere viel empfindlicher als die schwach infizierten.

Tabelle 3. *Meerschweinchenversuche.*

Nr. des Tieres	Gewicht in g	Infektion ip. mg	Behandlungsmodus ip.*)	Zahl der Injekt.	Tod	Sektionsbefund
1 (771) Kontrolle	250	50	—	—	N.21Tg. getötet	Tbc. des Netzes, Portaldrüse, Milz Trachealdrüsen
2 (752)	350	50	Kurz nach Infekt 1,5 cg	—	†7	Tbc. des Netzes, der Milz
3 (753)	350	50	Desgl.	—	†8	Tbc. des Netzes der Milz, Portaldrüse
4 (754)	350	50	Tbc. gemischt mit 1,5 cg	—	†1	Peritonitis
5 (755)	350	50	Desgl.	—	†21	Mäßige Tbc. des Netzes, Portaldrüse linsengroß derb, Tbc. +, Milz und Portaldrüse auf Meerschw. verimpft: Milzschwellung, verkäste Cubitaldrüse
6 (772) Kontrolle	350	$^1/_{10000}$	—	—	†54	Milz 4 mal normal, ausgedehnte Tbc. von Netz, Portal-Mesenterialdrüsen, Leber, Lungen
7 (769) Kontrolle	320	$^1/_{10000}$	—	—	†74	Wie 772
8 (751)	370	$^1/_{10000}$	Kurz nach Infekt 1,5 cg	1	†86	Netz o. V. Milz 2 mal normal, 1 submil. Herd; Lunge rechter Unterlappen vereinzelte Tuberkel
9 (756)	350	$^1/_{10000}$	Desgl.	1	†63	Wie 751
10 (760)	340	$^1/_{10000}$	Tbc. gemischt mit 1,5 cg	1	†1	Peritonitis
11 (765)	340	$^1/_{10000}$	Desgl.	1	†74	Milz 2—3 mal normal, einzelne miliare Knötchen, Cubitaldrüse verkäst, Portaldrüse, Netz große Knoten, Lungen einzelne miliare Knötchen
12 (757)	270	$^1/_{10000}$	Nach 4 Tagen, dann alle 4 Tage 1 cg	14	†74	Milz 4—5 mal normal, durchsetzt von Tuberkeln, ausgedehnte käsige Herde in Lungen, Leber durchsetzt von Tuberkeln
13 (763)	270	$^1/_{10000}$	(desgl.)	15	†78	Ausgedehnte Tbc. wie 757
14 (762)	300	$^1/_{10000}$	Nach 10 Tg., dann alle 4 Tage 1 cg	9	†56	Tbc. von Netz, Milz, Portal- und Mesenterialdrüsen, Lungen
15 (766)	300	$^1/_{10000}$	(desgl.)	2	†14	Pneumonie
16 (764)	320	$^1/_{10000}$	Nach 3 Wch., dann alle 4 Tg. 1 cg	9	†55	Schwere Tbc. der Milz, Leber, Lungen
17 (767)	320	$^1/_{10000}$	(desgl.)	—	†10	Pneumonie

Weiterhin prüften wir das Sanocrysin auch bei künstlich infizierten Kaninchen. In 4 Versuchen an 76 Kaninchen wurde die Infektionsdosis zwischen 1 bis $^1/_{100}$ mg der Kultur GA intravenös variiert. $^1/_{100}$ mg dieser Kultur tötet bei intravenöser Infektion Kaninchen in 8—10 Wochen.

*) Sanocrysindosen in Zentigramm pro Kilo Körpergewicht.

Tabelle 4. *Kaninchenversuch I. (Stamm G. A.)*

Nr. des Tieres	Gewicht g	Infektion iv. mg	Behandlungsmodus iv.*)	Zahl der Injektionen	Tod	Sektionsbefund
1 (125) Kontrolle	2900	1	—	—	Wird getötet nach 20 Tag.	Milz 2—3 mal normal, mehrere submil. Tuberkel in der Niere. Beide Lungen völlig durchsetzt von vielfach konfluierenden und verkästen Tuberkeln
2 (120)	2500	1	Sofort, dann jed. Tg. 0,04 g	3	$\dagger_{10}$	Nieren, Lungen entzündlich verändert. Giftwirkung?
3 (122)	2500	1	Desgl.	3	$\dagger_{14}$	In beiden Lungen mäßig zahlreiche submiliare Knötchen. Milz leicht vergrößert
4 (124)	2600	1	Sofort, dann alle 4 Tage 0,04 g	5	Wird getötet nach 20 Tag.	Milz 2 mal normal, mehrere submiliare Tuberkel der Nieren, in beiden Lungen zahlreiche Tuberkel
5 (126)	2600	1	Desgl.	5	$\dagger_{20}$	Milz 2 mal normal, in beiden Lungen zahlreiche Tuberkel. Nieren o. B.
6 (123)	2700	1	Sofort, dann jed. Tg. 0,06 g	3	$\dagger_{7}$	Makroskopisch o. B. Lungen verimpft auf Meerschweinchen. Stirbt nach 63 Tagen, ausgedehnte Tuberkulose
7 (117)	2400	1	Desgl.	1	$\dagger_{4}$	Makroskopisch o. B.

Das Sanocrysin wurde in den höchst ertragenen Dosen entweder mit der Infektionsdosis gemischt, intravenös injiziert oder zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion gespritzt.

Um einen genauen Einblick in die Art der von uns gewählten Infektion und Behandlung zu gewähren, bringen wir die Kaninchenversuche I und II in tabellarischer Übersicht (Tabelle 4 u. 5).

Im ersten Versuch wurden die bereits toxisch wirkenden Dosen von 0,04 und 0,06 g Sanocrysin sofort nach der Infektion, alsdann 3—5 mal wiederholt. Die Tiere starben vorzeitig nach 4—20 Tagen, die Kontrolle und ein behandeltes Tier wurden am 20. Tage getötet. Die Sektion ergab keine wesentlichen Unterschiede der behandelten Tiere gegenüber der Kontrolle. Im zweiten Versuch mit 17 Kaninchen wurde die Infektionsdosis ebenfalls zwischen 1 mg und $^1/_{100}$ mg variiert. Behandelt wurde mit der ertragenen Dosis von 2 cg. Trotz weitgehender Abänderung in der Zeit des Beginnes der Behandlung und der weiteren Zufuhr von Sanocrysin war eine günstige Wirkung auf den Tuberkuloseablauf der behandelten Tiere nicht nachzuweisen.

*) Dosen in Gramm pro Kilo Körpergewicht.

Tabelle 5. *Kaninchenversuch II. (Stamm G. A.)*

Nr. des Tieres	Gewicht in g	Infektion iv. mg	Behandlungsmodus iv.*)	Zahl der Injekt.	Tod	Sektionsbefund
1 (107) Kontrolle	3200	1	—	—	†15	Milz 2—3 mal normal. Beide Lungen weisen zahlreiche submiliare bis miliare Knötchen auf. In beiden Nieren vereinzelte submiliare Tuberkel
2 (98)	2500	1	Tbc. gemischt mit 0.02 g	—	†16	Milz 2—3 mal normal, in beiden Lungen zahlreiche bis linsenkorngroße Tuberkel
3 (99)	2500	1	Desgl.	—	†20	Milz 2 mal normal beide Lungen durchsetzt von zahlreichen submiliaren und miliaren grauen Tub.
4 (105)	2450	1	Nach 5 Min., dann jeden Tag 0,02 g	6	†14	Milz wenig geschwollen. In beiden Lungen mehrere submiliare Tuberkel
5 (104)	2500	1	Nach 8 Tg., dann jeden Tag 0,02 g	2	†16	Milz 3 mal normal. Ausgedehnte miliare Tuberkulose beider Lungen
6 (115)	2400	1		3	†21	Milz stark vergrößert. Ausgedehnte Tuberkulose der Lungen
7 (102)	2000	1	Nach 10 Tg., dann jeden Tag 0,02 g	1	†18	Milz 2 mal normal, in beiden Lungen zahlreiche Tuberkel
8 (103)	2150	1		2	†29	Milz 2 mal normal. Starke miliare Tuberkulose der Lungen. In beiden Nieren zahlreiche submiliare Tuberkel
9 (110) Kontrolle	3100	1/100	—	—	†27	Milz 2 mal normal, in beiden Lungen ausgedehnte käsige Herde. Einzelne Tuberkel in den Nieren
10 (114) Kontrolle	2400	1/100	—	—	Wird getötet n. 18 Tg.	Milz mäßig geschwollen. In beiden Lungen submiliare bis miliare z. T. verkäste Tuberkel
11 (108)	2600	1/100	Tbc. gemischt mit 0,02 g	—	†13	Milz stark vergrößert, Lungen, Nieren zahlreiche Tuberkel
12 (112)	2550	1/100	Desgl.	—	†43	Milz 3 mal normal, Nieren einzelne Tuberkel, Lunge durchsetzt von konfluierenden verkästen Tuberkeln
13 (109)	2500	1/100	Nach 5 Min. 0,02 g	—	†34	Milz 2—3 mal normal, Tuberkulose der Milz, Lungen, Nieren
14 (111)	2500	1/100	Nach 5 Min., dann jeden Tag 0,029 g	—	†18	Milz mäßig geschwollen, in beiden Lungen zahlreiche teilweise konfluierende bis miliare Tuberkel
15 (116)	2100	1/100	Nach 8 Tagen, dann alle 4 Tage 0,02 g	—	†26	Milz mäßig geschwollen, in beiden Lungen mehrere miliare, verkäste Tuberkel, außerdem zahlreiche graue Knötchen

*) Dosen in Gramm pro Kilo Körpergewicht.

Tabelle 5. *(Fortsetzung.)*

Nr. des Tieres	Gewicht in g	Infektion iv. mg	Behandlungsmodus iv.*)	Zahl der Injekt.	Tod	Sektionsbefund
16 (113)	2400	$^1/_{100}$	Nach 8 Tagen, dann alle 4 Tage 0,02 g	—	†27	Milz mäßig geschwollen, in beiden Lungen zahlreiche, teils verkäste Tuberkel. In den Nieren vereinzelte Tuberkel
17 (97)	2250	$^1/_{100}$	Nach 10 Tg., dann alle Tage 0,02 g	—	†40	Milz mäßig geschwollen. In beiden Lungen zahlreiche, vielfach konfluierende, meist verkäste Tuberkel. Mehrere Tnb. in den Nieren

In einem 3. Versuch an 30 Kaninchen wurden 10 Tiere mit 1 mg, 8 Tiere mit $^1/_{10}$ mg, 12 Tiere mit $^1/_{100}$ mg Kultur GA iv. infiziert, davon je 2 und 2 und 4 Tiere als Kontrollen benutzt. Mit der Behandlung wurde sofort nach der Infektion begonnen, die Sanocrysindosen wechselten zwischen 0,04—0 01g. Bei den ersten beiden Serien wurde die Goldbehandlung weiterhin jeden 3. Tag mit 0,02—0,001 g fortgesetzt. Bei der 3. Serie der Tiere wurde jeden 5. bzw. 8. Tag mit 0,01 g bis 0,001 g fortgefahren. Das Resultat dieses Versuches läßt sich dahin zusammenfassen, daß in vereinzelten Fällen sowohl der behandelten, als auch bei einigen Kontrolltieren eine weniger ausgebreitete Tuberkulose, als bei der Mehrzahl der Tiere gefunden wurde. Es war somit eine Heilwirkung des Sanocrysins nicht nachweisbar.

Endlich sollte ein letzter Versuch an 20 Kaninchen zeigen, ob mit *täglicher Zufuhr kleiner Sanocrysindosen* mehr zu erreichen war. Je 10 Tiere wurden mit 1 mg bzw. $^1/_{100}$ mg des Stammes GA iv. infiziert, davon dienten je 2 bzw. 4 Tiere als Kontrollen. Je 2 Kaninchen beider Serien wurden 30 Min. nach der Infektion mit 0,005 g, dann täglich mit derselben Dosis weiterbehandelt, nach je 6—8 Injektionstagen wurden 2 mal 4 tägige behandlungsfreie Pausen eingeschoben. 2 weitere Tiere beider Serien erhielten täglich ohne Pause 1 mg Sanocrysin, 2 Tiere täglich 1 mg mit 4 tägigen Pausen, wie oben geschildert. Dieser Versuch ergab eine verkürzte Lebensdauer der behandelten Kaninchen, die Sektion wies keinen Unterschied in der Ausbreitung der tuberkulösen Organveränderungen auf.

Somit sind unsere Versuche an Meerschweinchen und Kaninchen (ebenso wie die entsprechenden von *Möllgaard*, *Deist* und *O. Bang*) negativ verlaufen. Selbst die Einspritzung eines Gemisches von Tuberkelbacillen und Sanocrysin in 2 proz. Lösung ließ nicht die geringste Wirkung des Mittels erkennen.

Die Kälberversuche Möllgaards.

Die entscheidenden Versuche zum Nachweise einer echten chemotherapeutischen Wirkung im Sinne einer Abtötung der Tuberkelbacillen im infizierten Tierkörper stellte *Möllgaard* an 35 *Kälbern* an. In Anbetracht ihrer Wichtigkeit haben wir diese Versuche, über die *Möllgaard* selbst keine tabellarische Zusammenfassung gibt, in den Tab. 6 und 7 übersichtlich zusammengestellt.

*) Dosen in Gramm pro Kilo Körpergewicht.

Tabelle 6. *Kälberversuche von Möllgaard. Kultur L.*

…s.Nr. Seite Möll…ard…hen …ches	Infektion iv. g	Nr. des Tieres	Gewicht kg	Sanocrysinbehandlung iv. Beginn*) Tag	Dosen**) g	Gesamtmenge g	Behandlungsdauer	Erfolg
I …96 …is …99	0,02	22/52 Kontrolle	42	—	—	—	—	Wird nach 6 Monaten getötet. Lungen, Nieren, Drüsen, Augen schwere Tuberkulose
	0,02	21/51	54	11.	9×0,03 (1,5)	0,27 (13,5)	6 Mon.	Wird nach 7 Monaten getötet. Vereinzelte Kalkherde in d. Organen
	0,02	23/53	57	19.	5×0,027 (1,5)	0,135 (7,5)	5 Mon.	Wird nach $6^1/_2$ Monaten getötet. Außer in Schulterdrüsen keine tuberkulösen Herde
II 100 …is …03	0,05	30/155 Kontrolle	110	—	—	—	—	$†_{56}$. Septikämie, käsige Lungentuberkulose
	0,025	20/157	50	10.	2×0,02 (1,0)	0,04 (2,0)	4 Tage	$†_{14}$. Tuberkulinschock. Miliare Lungentbc.
	0,05	31/156	101	11.	13×0,01—0,02 (1,0—2,0)	0,19 (19)	3 Mon.	Lebt. Guter Zustand
III 103 bis 105	0,1	8/41 Kontrolle	90	—	—	—	—	$†_{18}$. Miliare Lungentub.
	0,1	6/42	96	16.	7×0,02 · 1×0,03 (2,0—3,0)	0,17 (17)	2 Mon.	$†_{75}$ an der „Bleading disease". Vereinzelte Tuberkel in Lungen und Nieren
IV …105 bis 109	0,05	146/184 Kontrolle	137	—	—	—	—	$†_{27}$. Schwere Lungentub.
	0,065	147/185	165	11.	8×0,006—0,015 (1,0—2,5)	0,1 (16,5)	$1^1/_2$ Mon.	Lebt. Guter Zustand
	0,06	148/186	156	11.	8×0,0065—0,02 (1,0—3,0)	0,1 (16,5)	$1^1/_2$ Mon.	Lebt. Guter Zustand
	0,06	141/183	153	11.	6×0,005—0,015 (1,0—2,5)	0,07 (11)	1 Mon.	Getötet nach $4^1/_2$ Wochen. Viele miliare bis erbsengroße Tuberkel in Lungen, Bronchial- und Mediastinaldrüsen
V …116 bis 120	0,02	60/187 Kontrolle	128	—	—	—	—	Getötet nach 80 Tagen. Ausgedehnte Tuberkulose der Lungen, Drüsen, Nieren, Milz
	0,02	62/172	120	14.	7×0,008—0,02 (1,0—2,5)	0,09 (11,5)	2 Mon.	Getötet nach 81 Tagen. Vereinzelte Tuberkel der Lungen
	0,02	63/169	114	12.	11×0,009—0,02 (1,0—2,5)	0,18 (20,5)	$2^1/_2$ Mon.	Getötet nach 98 Tagen. Vereinzelte verkalkte Tuberkel der Lungen
…***) …S. 136	0,05	4/44	30	5.	11×0,013—0,03 (0,4—1,0)	0,29 (8,8)	4 Mon.	† $4^1/_2$ Mon. Beide Lungen übersät mit käsigen Tuberkeln mit fibröser Umwallung, einige Tuberkel der Nieren und Leber
b …S. 137	0,07	124/177	107	11.	4×0,015—0,017 (1,5—1,75)	0,05 (5,5)	14 Tage	† im Schock. Beide Lungen ausgedehnte miliare Tub.
c …S. 138	0,05	32/163	52	8.	2×0,02 (1,0)	0,04 (2,0)	3 Tage	† im Serumschock. Pneumonie, miliare Tub.
d …S. 139	0,11	123/176	144	11.	6×0,007—0,017 (1,0—2,5)	0,05 (7,5)	1 Mon.	† miliare Lungentuberkulose. Miliare Tuberkel in Leber, Nieren

*) Tag der Infektion mitgerechnet.

**) In g pro Kilo Körpergewicht. Die Zahlen in Klammern geben die absolute Menge an.

***) Versuche a—d sind ohne Kontrolle angestellt.

Tabelle 7. *Kälberversuche Kultur Y.*

Vers.Nr. m. Seite d. Möllgaardschen Buches	Infektion g	Nr. der Tiere	Gewicht kg	Sanocrysinbehandlung: Beginn Tag	Dosen*) g	Gesamtmenge g	Behandlungsdauer	Erfolg
I S. 109 bis 111	0,03	4/119 Kontrolle?	47	11.	1×0,03 (1,5)	0,03 (1,5)	—	†12. 21 Std. nach einer Sanocrysininjektion unter schwerer Dyspnoe. Enorme miliare Tub. der Lungen
	0,03	15/118	43	15.	5×0,02 (1,0)	0,1 (5)	3 Wo.	†41. Enteritis haemorrhagica. In unteren Lungenlappen viele miliare Tuberkel
	0,03	17/121	56	15.	14×0,02—0,04 (1,0—2,0)	0,35 (17,5)	2 Mon.	Nach 5 Mon. getötet. Ein verkäster, einige fibröse kleine Lungenherde
II S. 113 bis 114	0,03	21/128 Kontrolle	39	—	—	—	—	Am 39. Tage in moribundem Zustande getötet. Tuberkulöse Pneumonie mit großen käsigen Tuberkeln. Zahlreiche Tuberkel in Bronchial- und Mediastinaldrüsen
	0,04	18/125	36	10.	18×0,014—0,04 (0,5—1,5)	0,5 (18,5)	5 Mon.	Getötet nach 6 Mon. Wenige verkalkte Tuberkel in beiden Lungen
III S. 120 bis 121	0,01	3/113 Kontrolle??	41	—	—	—	—	(16 Tg. später infiziert als 9/110) Wird nach 5 Mon. getötet. Mäßige Tuberkulose der Lungen
	0,01	9/110	45	25.	13×0,02—0,03 (1,0—1,5)	0,37 (16,5)	4 Mon.	Nach 6 Mon. getötet. Vereinzelte, verkalkte Lungentuberkel
IV S. 123 bis 129	0,005	15/81 Kontrolle	50	—	—	—	—	Nach 4 Mon. getötet. Miliare Lungentuberkulose
	0,005	19/88 Kontrolle	46	—	—	—	—	Nach 4 Mon. getötet. Miliare Lungentuberkulose
	0,005	13/79	51	13.	7×0,02—0,03 (1,0—1,5)	0,15 (7,5)	—	Nach 4 Mon. getötet. Vereinzelte, verkalkte Lungenherde
V S. 130 bis 131	0,02	11/15 Kontrolle	40	—	—	—	—	Nach 6 Mon. getötet. Ausgedehnte miliare und verkäste Lungentuberkulose
	0,02	12/16	41	13.	11×0,01—0,02 (0,5—1,0)	0,18 (7,35)	$3^1/_2$ Mon.	Nach 6 Mon. getötet. Viele verkalkte Lungenherde
a**) S. 125	0,005	11/85	45	14.	7×0,02 (1,0)	0,14 (7)	2 Mon.	(Dieses, sowie Kalb 12/86 und 24/96 dienten zur Prüfung der Heilwirkung des Serums auf den Tuberkulinschock.) Nach 4 Mon. getötet. Tuberkulosefrei
b S. 126	0,005	12/86	46	12.	8×0,02 (1,0)	0,16 (8)	2 Mon.	Nach 5 Mon. getötet. Vereinzelte, verkalkte Lungenherde
c S. 127	0,005	14/80	41	13.	7×0,025—0,03 (1,0—1,5)	0,2 (8,5)	$2^1/_2$ Mon.	Nach 11 Mon. getötet. Tuberkulosefrei
d S. 129	0,01	24/96	51	14.	4×0,02 (1,0)	0,08 (4)	1 Mon.	Nach 2 Mon. getötet. Tuberkulosefrei

*) Dosen wie in der vorhergehenden Tabelle.
**) Versuche a—d sind ohne Kontrolle angestellt.

Überblicken wir die Kälberversuche *Möllgaards*, so müssen die Versuche a—d beider Tabellen für die Beurteilung der Sanocrysinwirkung ausscheiden, da sie ohne Kontrollen angestellt sind. Ebenso ist der Versuch III mit Kultur Y nicht zu verwerten, da die Kontrolle 16 Tage später infiziert wurde als das behandelte Tier. Von den 9 übrigbleibenden Versuchen verlieren 7 insofern an Bedeutung, als die Kontrollen nicht an der Infektion eingegangen, sondern interkurrent gestorben bzw. nach Monaten getötet worden sind. Natürlich kann man solchen Versuchen nicht deshalb jede Beweiskraft absprechen, aber die hauptsächlichste Quelle für *Fehlschlüsse* auf diesem Gebiet, auf die wir noch mehrfach zurückkommen, nämlich die individuell verschiedene natürliche Resistenz der Versuchstiere, spielt naturgemäß eine um so größere Rolle, je milder der Verlauf der Infektion ist. Aus demselben Grunde haben die Versuche mit der schwächer virulenten Kultur Y an sich weniger Beweiskraft als die mit der virulenten Kultur L angestellten. Bei dem Versuch II (K. Y.), bei dem die Kontrolle in moribundem Zustande getötet und schwer tuberkulös befunden wurde, sind trotzdem gewisse Zweifel berechtigt, ob das Tier tatsächlich spontan gestorben wäre, wenn man es sich selbst überlassen hätte. In einem unserer Kälberversuche haben wir es jedenfalls erlebt, daß ein moribund scheinendes Tier sich erholte und 11 Monate später getötet, sogar als frei von Tuberkulose sich erwies (Kalb 10 Vers. I).

Nur in 2 von den Kälberversuchen *Möllgaards sind die Kontrollen infolge der Infektion verendet.* Sehen wir uns diese genauer an, so fällt in Versuch III (K. L) auf, daß das Kontrollrind nach 18 Tagen an schwerer Tuberkulose verendete, das behandelte Tier aber bei seinem nach $2^1/_2$ Monaten erfolgten Tode an interkurrierender Krankheit nur eine geringe Tuberkulose aufwies, trotzdem bei ihm die Behandlung *erst 2 Tage vor dem Tode der Kontrolle* begann! Es ist uns nach unseren eigenen Erfahrungen höchst unwahrscheinlich, daß das behandelte Tier eine gleichschwere Infektion wie die Kontrolle durchgemacht hat. Sonst dürfte die zu so später Zeit begonnene Behandlung kaum von so eklatantem Erfolg gewesen sein. Wir glauben vielmehr, daß bei den beiden Tieren dieses Versuchs von vornherein erhebliche Unterschiede ihrer natürlichen Resistenz gegen die Tuberkuloseinfektion bestanden haben, und daß hieraus wenigstens zum Teil der verschiedene Ausgang der Infektion zu erklären ist.

Im Versuch IV (Tab. 6) starb das Kontrollrind nach 27 Tagen an schwerer Lungentuberkulose, die 3 behandelten Tiere überlebten die Infektion, eins davon, nach $4^1/_2$ Wochen getötet, zeigte ausgedehnte Tuberkulose der Lungen, vielleicht etwas geringer als die Kontrolle. Dies ist der einzige Versuch, der ganz klare Verhältnisse gibt. Leider steht hier drei behandelten Tieren nur eine Kontrolle gegenüber.

Wir haben aus dem Versuch III geschlossen, daß sogar bei schwerster Infektion (10 cg!) sich bei den Kälbern erhebliche Unterschiede der natür-

lichen Resistenz geltend machen können. Um wieviel mehr wird dies *bei schwächerer Infektion* der Fall sein, bei der die Kontrollrinder die Infektion überstehen. Auch nach unseren eigenen Erfahrungen ist hier unbedingt mit Resistenzverschiedenheiten der Kälber zu rechnen, *die zu Täuschungen Veranlassung geben können*; wobei wir dahingestellt sein lassen, inwieweit bei einzelnen Tieren daneben eine durch frühere Spontaninfektion erworbene Immunität in Betracht kommt. Wir wissen ja, daß auch die Tuberkulinreaktion, die bei den Tieren *Möllgaards* negativ gewesen ist, manchmal versagen kann. Der Einwand, daß Resistenzverschiedenheiten der Tiere und die zu wenig virulente Kultur die Versuchsergebnisse *Möllgaards* empfindlich gestört haben könnten, wird auch von amerikanischer Seite und der englischen Kommission erhoben*).

Vielleicht lassen sich Unregelmäßigkeiten im Erfolge intravenöser Infektion teilweise auch dadurch erklären, daß die *von dem tuberkuloseempfänglichsten Organ*, der Lunge, aus dem Blut abgefangene Bacillenmenge bei den einzelnen Tieren verschieden ist.

Immerhin ist auffallend, daß in den Versuchen mit den überlebenden Kontrollen ebenso wie in denjenigen, wo die Kontrollen interkurrent gestorben sind, *durchweg der Befund bei den behandelten günstiger ist als bei den nicht behandelten Tieren.* Das kann wohl kaum Zufall sein und spricht *mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit* für eine Heilwirkung des Goldes, wenn nicht etwa in den von *Möllgaard* nur kurz erwähnten Versuchsreihen (vgl. S. 95 seines Buches), in denen die Kontrollen nicht genügend erkrankten, die behandelten Kälber tuberkulös geworden sind. Ein *sicheres* Urteil kann aus den Kälberversuchen *Möllgaards* auf keinen Fall gewonnen werden. Ob dem von *Möllgaard* neben dem Sanocrysin in seinen Versuchen zur Behandlung verwandten *Immunserum* ein Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung eingeräumt werden muß, ist aus seinen Versuchen nicht zu ersehen.

Unsere Versuche an Kälbern.

Es wurden von uns zur Nachprüfung der Möllgaardschen Experimente 3 Versuche an im ganzen 20 Kälbern angestellt; eine vorläufige Mitteilung darüber hat bereits *Neufeld* in der Dtsch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 4 gemacht. Die Tiere wurden erst infiziert, nachdem die Tuberkulinprüfung (0,1 ccm Alttuberkulin subcutan) ein negatives Ergebnis gehabt hatte. Dies war bei sämtlichen Kälbern der 3 Versuche der Fall, mit Ausnahme der Kälber 27 und 29 des Versuches III; diese reagierten positiv und erwiesen sich auch durch die 2 Monate später vorgenommene Sektion als spontaninfiziert (alte verkalkte Herde in den Tracheal- bzw. Media-

*) Journ. of the Americ. med. assoc. 84, 24. 1. 1925; Brit. med. journ. 1925, Nr. 3357, S. 813 (kurzes Referat).

stinallymphknoten). Diese beiden Tiere dienten mit 2 anderen tuberkulinnegativen des Versuchs als Kontrollen.

Die Infektion geschah intravenös in die große Halsvene. Die zur Infektion benutzte Kultur des Typus bovinus-Stamm GA, eine alte Laboratoriumskultur, hatte für Kaninchen nur eine mittlere Virulenz. $^1/_{100}$ mg tötete auf iv. Wege Kaninchen erst in 8—10 Wochen. Die Virulenz dieser Kultur für Rinder war uns bei Beginn der Versuche nicht bekannt. Da die Kontrolle aus dem Versuch 1 die Infektion mit 1 cg überstand, wählten wir für die beiden anderen Versuche 3 cg als Infektionsdosis. Der Verlauf dieser beiden Versuche macht es wahrscheinlich, daß für Kälber von einem Gewicht von 100—160 kg auch diese Bacillenmenge auf intravenösem Wege nicht sicher tödlich wirkt. Wir haben also einen Tuberkelbacillenstamm benutzt, dessen Virulenz nur eine mäßige war und sich derjenigen der Möllgaardschen Kultur L (s. o.) annähert; immerhin war aber die Wirkung unserer Kultur auf die Kälber stärker.

1 cg bzw. 3 cg Tuberkelbacillenkultur wurden stets in einem Kochsalzlösungvolumen von 5 ccm injiziert. Das Alter der Kultur betrug im ersten Versuch 3 Wochen, im zweiten 10, im dritten 7 Tage.

Das Sanocrysin wurde teils allein, teils mit Tuberkuloseimmunserum zusammen intravenös gegeben. Das Immunserum wurde uns zum Zweck dieser Versuche vom Kopenhagener staatlichen Seruminstitut (Direktor Dr. *Madsen*), das Sanocrysin von Herrn Prof. *Möllgaard* bereitwilligst zur Verfügung gestellt; beiden Herren möchten wir für ihr Entgegenkommen unsern besten Dank aussprechen. Die Einzeldosen betrugen zwischen 1 und 3 cg Sanocrysin pro 1 kg Körpergewicht, die Gesamtmenge 1—8 cg. Die Behandlung wurde bei einzelnen Tieren unmittelbar nach der Infektion ($^1/_2$ bis 1 Stunde danach) begonnen, bei den übrigen am 4., 7., 9., 13. und 20. Tag nach der Infektion. Meist erfolgten dann, und zwar gewöhnlich in Intervallen von 4—7 Tagen, weitere Injektionen des Mittels. Öfter als 5 mal wurde kein Tier behandelt, die meisten unserer Tiere erhielten nur 2 Injektionen. Die Dosierung war also durchweg, wenn sie sich auch in den ersten beiden Versuchen annähernd dem von *Möllgaard* angegebenen Schema anpaßte, niedriger als in *Möllgaards* Versuchen. Wir glauben, daß unsere Tiere deswegen lange nicht so große Dosen vertrugen, weil sie schwerer infiziert waren; vgl. unsere obigen Bemerkungen über die verschiedene Toleranz der Meerschweinchen je nach der Schwere der Infektion.

Im folgenden sei über den Verlauf unserer Versuche kurz berichtet.

Versuch 1. 4 Kälber. Kalb 10 (110 kg) Kontrolle. Kalb 11 (122 kg), Kalb 12 (112 kg), Kalb 13 (120 kg) mit Sanocrysin behandelt. Infektion am 10. II. 1925 mit 1 cg Tbc. bovin GA intravenös. Kalb 11 erhielt sofort nach der Infektion 3 cg Sanocrysin pro Kilogramm Körpergewicht (absolute Menge = 3,66 g), am 7. Tage 1 cg (1,22 g), am 11. Tage wieder 1 cg, am 15. Tage 2 und endlich am 31. Tage 1 cg Sanocrysin. Kalb 12 erhielt am 4. Tage 1 cg, am 8. Tage 1 cg, am

12. Tage nochmals 1 cg Sanocrysin, Kalb 13 erstmalig am 9. Tage 1, am 14. Tage 2 cg pro Kilogramm Körpergewicht.

Die Sanocrysininjektion war mehrfach von kurzdauerndem Temperaturanstieg, Albuminurie und Durchfall gefolgt. Während der Behandlung verloren die Tiere mehr oder weniger stark an Körpergewicht. Bei dem Kalb 13 betrug der Gewichtsverlust innerhalb von 4 Wochen 22 kg Hieran ist offenbar hauptsächlich die Goldbehandlung schuld. Wir haben später — auch bei Verwendung kleiner Sanocrysindosen — die Beobachtung gemacht, daß die behandelten Tiere und zwar Kälber wie Schafe im allgemeinen mehr an Gewicht verloren als die nicht behandelten Kontrollen.

Sämtliche 3 mit Sanocrysin behandelten Kälber starben 34, 32 und 27 Tage nach der Infektion an Pneumonie der vorderen Lungenabschnitte und disseminierter miliarer Tuberkulose der Lungen.

Die nicht spezifische (?) Pneumonie der vorderen Lungenabschnitte ist eine außerordentlich häufige Komplikation der Tuberkulose von Kälbern und Schafen, welche mit größeren Bacillenmengen intravenös infiziert worden sind. Man findet in solchen Herden mehrfach den Bacillus bipolaris septicus in Reinkultur. Vielleicht gibt die Schädigung der Lungen durch die Toxine des Tuberkelbacillus die Disposition ab für derartige Pneumonien. Da wir sie bei unseren spontan verendeten Kälbern und Schafen niemals ganz vermißt haben, ist ihrer später meist nicht mehr besonders Erwähnung getan, vielmehr lediglich der bei der Sektion nachweisbare spezifisch tuberkulöse Prozeß berücksichtigt worden. Es sei noch erwähnt, daß gewöhnlich diese pneumonischen Prozesse die größte Ausdehnung hatten bei den mit größeren Sanocrysindosen behandelten Tieren. Bei der Miliartuberkulose der Lungen handelt es sich nach dem mikroskopischen Bild im wesentlichen um einen exsudativen tuberkulösen Prozeß. Daraus erklärt sich wohl auch die hier und da von uns beobachtete Rückbildungsfähigkeit der unter unseren Versuchsbedingungen erzeugten Lungentuberkulose (Kalb 10 des Versuches 1, Kalb 19 des Versuches 2).

Die Kontrolle, Kalb 10 des Versuches 1 erkrankte wie die behandelten Tiere etwa 12 Tage nach der Infektion schwer mit hohem Fieber und hochgradiger Dyspnöe, woraus wohl auf das Bestehen ausgedehnter exsudativ tuberkulöser Veränderungen beider Lungen geschlossen werden darf, das Körpergewicht blieb auffallenderweise unverändert. Trotz der schweren Erkrankung, die uns täglich das Ableben des Tieres erwarten ließ, erholte sich das Kalb wieder. 11 Monate post infectionem bei bestem Gesundheitszustand getötet, zeigte es keine Spur von Tuberkulose, weder in den Lungen noch in den zugehörigen Lymphknoten noch sonstwo im Körper. Natürlich besteht die Möglichkeit, daß bei der Sektion kleinste Herde z. B. der Lymphknoten der Untersuchung entgangen sind. Das ändert aber nichts an der bemerkenswerten Tatsache, daß in unserem ersten Versuch ein Kalb *lediglich vermöge seiner natürlichen Widerstandsfähigkeit die augenscheinlich schwere experimentelle Infektion überwunden hat.*

Andererseits zeigt der Versuch allem Anschein nach eine Beförderung der tuberkulösen Infektion durch die angewandten Sanocrysindosen.

Versuch 2. 6 Kälber. 4 davon mit Sanocrysin behandelt. Aber nur 1 Tier (Kalb 17) erhielt das Sanocrysin allein, die 3 anderen Kälber 16, 18 und 19 gleichzeitig mit 40 ccm Tuberkuloseimmunrinderserum Kopenhagen. Zur Kontrolle der Serumwirkung wurde ein Kalb (Nr. 15) nur mit dem Serum behandelt und zwar sofort, am 5. Tage, am 7., dann am 12., 23. und 29. Tage. Kalb 14 blieb ganz ohne Behandlung. Die Sanocrysinkälber (Gewicht 150—180 kg) erhielten das Mittel in folgenden Einzeldosen: Kalb 16 sofort 3 cg, am 5. Tage nach der Infektion wieder pro Kilogramm 3 cg (absolute Menge 4,5 g). Kalb 17 unmittelbar nach der Infektion 3 cg, am 5. Tage 2 cg pro 1 kg Körpergewicht. Kalb 18 erstmalig am 7. Tage 2 cg, am 12., 23., 33. Tage je 1 cg pro Kilogramm Körpergewicht. Kalb 19 bekam erstmalig am 7. Tag, dann noch einmal am 12. Tag 1 cg Sanocrysin pro 1 kg Körpergewicht. Im Anschluß an die Sanocrysininjektionen kam es wieder häufig zu einer leichten Albuminurie und zwar auch bei den gleichzeitig mit Serum behandelten Rindern. Die Albuminurie ging spontan nach wenigen Wochen wieder zurück. Bei den Kälbern 18 und 19 war die Sanocrysinseruminjektion mehrfach von einer akuten Dyspnöe gefolgt. Ein Einfluß auf den Temperaturablauf trat im Versuch 2 nirgends deutlich hervor. Da die Tiere schon wenige Tage nach der Infektion mit intermittierendem Fieber erkrankten und das Fieber wie bei den Kontrolltieren bald mit intermittierendem, bald mit kontinuierlichem Typus wochenlang anhielt, mußte behandelt werden ganz ohne Rücksicht auf den Fieberverlauf. Hätten wir nach *Möllgaard* das Abklingen der Temperatur nach der ersten Sanocrysingabe abwarten wollen, wäre es zu weiterer Behandlung nicht gekommen bzw. erst zu einer Zeit, zu der bereits eine Spontanheilung eingetreten.

Zuerst starben in diesem Versuch die beiden sofort, teils mit, teils ohne Serum behandelten Sanocrysinkälber 16 und 17, und zwar nach 18 bzw. 28 Tagen an käsiger Pneumonie von einer Ausdehnung, wie wir sie weder früher noch später bei unseren tuberkulösen Rindern beobachtet haben. Eine ganz besonders schwere Form der Tuberkulose zeigte das Kalb 16, das nur mit Sanocrysin ohne gleichzeitige Seruminjektion behandelt war. Trotzdem zwischen Infektion und Tod noch nicht 3 Wochen lagen, fanden sich käsig pneumonische Gebiete in den Lungen von Apfel- bis fast Kindskopfgröße, außerdem bis haselnußgroße käsige Knoten in der Milz, einem Organ, das sonst über eine ziemlich hohe Resistenz verfügt und in den anderen von uns beobachteten Fällen stets von derartigen *gröberen* spezifischen Veränderungen frei war. Ganz offenbar hat bei diesen beiden Kälbern die Behandlung die Resistenz der Tiere gegen die Tuberkuloseinfektion herabgesetzt. Nach 34 und 37 Tagen starben die beiden Kontrollkälber 14 und 15, nach 44 Tagen Kalb 18 an Pneumonie und Miliartuberkulose der Lungen. Das Kalb, das am wenigsten Sanocrysin erhalten hatte (Kalb 19) überlebte. Nach $^3/_4$ Jahr getötet, erwies es sich bei der Sektion frei von Tuberkulose. Auch bei diesem Tier sind möglicherweise kleine verkalkte Herde in den Lymphknoten übersehen worden; um solche festzustellen, hätte eine noch feinere Zerteilung der Organe vorgenommen werden müssen. Wie dem nun auch sei, jedenfalls kann die Tuberkulose bei dem Kalb 19 als *klinisch ausgeheilt* angesehen werden.

Bevor wir zur Besprechung dieses Versuchs übergehen, berichten wir kurz über den Verlauf unseres letzten größten Kläberversuchs. *In*

diesem haben wir auf Grund der Erfahrungen der beiden ersten Versuche das Möllgaardsche Behandlungsschema ganz verlassen und nur kleine Sanocrysingaben, stets zugleich mit Immunserum, verabfolgt.

Versuch 3. 10 Kälber (3 weitere wurden erfolglos mit dem neuen Goldpräparat Sulfocrysolgan behandelt und sollen im folgenden nicht mit berücksichtigt werden). Die Infektion erfolgte mit 3 cg unserer bovinen Kultur iv. Die Körpergewichte der Tiere betrugen zwischen 100 und 145 kg. Als Kontrollen dienten 2 tuberkulinnegative Kälber (Nr. 20 und 25) und 2 spontaninfizierte (Nr. 27 und 29). Hierzu muß bemerkt werden, daß das Kalb 25 ursprünglich zur Behandlung bestimmt war, wegen seiner sehr akut verlaufenden schweren Erkrankung aber *ohne* Behandlung blieb, da sie aussichtslos erschien. Dieses Tier hat deshalb als Kontrolle eigentlich keinen Wert. Die Beobachtung zeigt wieder aufs deutlichste, daß der Verlauf der Tuberkulose bei Kälbern, die mit gleicher Dosis infiziert wurden, von Anfang an recht verschieden sein kann. 2 Kälber (Nr. 22 und 24) wurden sofort nach der Infektion mit 1 cg Sanocrysin + Serum behandelt, Kalb 24 erhielt am 6. Tage noch einmal 1 cg pro Kilogramm Körpergewicht. Die Kälber 21, 26 und 32 bekamen am 13. Tage nach der Infektion erstmalig 1 cg pro 1 kg Gewicht, bei Kalb 21 und 32 wurde die Injektion der gleichen Dosis nach 1 Woche wiederholt. Kalb 23 erhielt erstmalig am 20. Tage, dann noch einmal am 30. Tage 1 cg Sanocrysin. Die absolute Menge Sanocrysin pro Tier betrug 1—1,45 g.

Die beiden tuberkulinnegativen Kontrollen starben nach 19 bzw. 20 Tagen an Pneunomie und disseminierter Milartuberkulose der Lungen. Die beiden tuberkulinpositiven Nr. 27 und 29 überlebten die Infektion; 7 Wochen nach der Infektion im besten Gesundheitszustande getötet, zeigten sie nur geringe tuberkulöse Veränderungen, Kalb 27 in beiden Lungen vereinzelte submiliare bis miliare graue glasige Knötchen. Die Knötchen waren teilweise rund, teils von eigentümlich sternförmigem Aussehen, woraus auf Rückbildung der Tuberkel geschlossen werden kann. In der linken Trachealdrüse fanden sich stecknadelkopf- bis fast erbsengroße käsig-kalkige Einsprengungen. Es handelt sich hier höchstwahrscheinlich um Residuen einer früheren Spontaninfektion. Bei Kalb 29 fand sich im caudalen Abschnitt des linken Lungenunterlappens ein über haselnußgroßer, käsig-kalkiger Herd, subpleural, in den übrigen Lungenabschnitten vereinzelte erbsengroße subpleural gelegene sehr derbe Knoten von gelbgrauer Farbe, daneben mehrere submiliare bis miliare graue glasige Knötchen. Die stark geschwollenen caudalen Mediastinaldrüsen waren von linsen- bis erbsengroßen, käsigkalkigen Herden durchsetzt. Der größere Herd im rechten Unterlappen, und die Kalkherde in den Mediastinaldrüsen sind mit Rücksicht auf ihr Alter wohl als Residuen früherer pulmonaler Spontaninfektion aufzufassen. Aus der positiven Tuberkulinprobe und dem Sektionsbefund ziehen wir den Schluß, daß die Kälber 27 und 29 die experimentelle Infektion vermöge ihrer durch Spontaninfektion erworbenen Immunität überstanden haben.

Von den mit Sanocrysin behandelten Rindern verendeten Kalb 24, 26 und 23 nach 32 bzw. 19 bzw. 30 Tagen an Pneumonie und disseminierter

Miliartuberkulose der Lungen. Kalb 22, 21 und 32 überlebten die Infektion. Nach einer einige Wochen dauernden Periode unregelmäßigen Fiebers erholten sich die Tiere, nahmen ständig an Gewicht zu und wurden bei gutem Gesundheitszustand 7 Wochen nach der Infektion getötet. Die Sektionsbefunde seien auszugsweise mitgeteilt.

Kalb 21. In beiden Lungen sehr zahlreiche submiliare bis miliare, teils runde, teils unregelmäßig begrenzte graue glasige Knötchen. Starke Schwellung der Tracheal- und Mediastinallymphknoten. In den Bronchialdrüsen miliare, weißliche, sehr derbe Herde. In den übrigen Organen nichts Besonderes.

Kalb 22. Lungen weisen starke Verdickung der Septen auf und nur ganz vereinzelte submiliare graue glasige Knötchen. Die Tracheal- und Mediastinaldrüsen zeigen markige Schwellung, auf den Schnittflächen sind vielfach grauweiße streifenförmige Herde sichtbar, keine mit Sicherheit als Tuberkel zu deutende Veränderungen. Die übrigen Organe ohne bemerkenswerten Befund.

Kalb 32. Beide Lungen von submiliaren bis miliaren grauen glasigen Knötchen völlig durchsetzt. Diese Knötchen sind nur zum Teil rund, zum Teil sternförmig. In den stark geschwollenen Tracheal-, Bronchial- und Mediastinaldrüsen zahlreiche graue bis grauweißliche erbsengroße Herde. Miliare Tuberkel der Leber und der Nieren.

Zunächst verdient hervorgehoben zu werden, daß bei keinem der 3 Tiere sich Veränderungen nachweisen ließen, die auf eine frühere Spontaninfektion hindeuten. Ferner ist der sehr geringe Befund beim Kalb 22 und die bei den Kälbern 21 und 32 nachgewiesenen Zeichen beginnender Rückbildung der Lungen- und Lymphknotentuberkel beachtenswert. Auf solche Heilungsvorgänge deutet die unregelmäßig zackige Begrenzung der Lungentuberkel und die weißliche Färbung der Lymphknotenherde hin.

Es sei noch erwähnt, daß Sanocrysinschädigungen (Albuminurie) nur bei einzelnen der behandelten Kälber und bei diesen nur in geringem Grade beobachtet werden konnten.

In der umstehenden Tabelle geben wir eine Übersicht über unsere sämtlichen Rinderversuche.

Überblicken wir das Ergebnis aller 3 Versuche, so scheint es auf den ersten Blick im Sinne der Möllgaardschen Versuche *zu Gunsten einer Heilwirkung des Sanocrysins* zu sprechen. Von 13 mit Sanocrysin behandelten Kälbern überlebten 4 also fast $^1/_3$ die Infektion. Der Sektionsbefund sämtlicher in augenscheinlich bestem Gesundheitszustand getöteter Tiere läßt sich wohl kaum anders deuten als im Sinne einer mehr oder weniger vollendeten *Heilung der Tuberkulose.* Nun handelt es sich aber offenbar bei unseren Experimenten, ähnlich wie in *Möllgaards* Versuchen, *zwar um eine schwere aber nicht unbedingt tödliche Infektion.* Schon im Kaninchenversuch erwies sich unsere Kultur G. A. als nicht hochvirulent. Das mit 1 cg der Kultur infizierte Kontrollrind 10 überlebte nach schwerer Erkrankung und war bei der Sektion ohne makroskopisch erkennbare tuberkulöse Veränderungen, und die spontaninfizierten Kälber 27 und 29

Tabelle 8. *Sanocrysinversuche an Kälbern.*

Versuch Nr. und Infektionsdosis	Nr. der Kälber	Sanocrysinbehandlung: Beginn der Behandlung	Einzelgaben in cg pro kg Körpergewicht	Zus. cg	Immunserum		Erfolg
I Infekt. 0,01 g iv.	10	—	—	—	—	Lebt!	Get. nach 11 Mon. Makrosk. keine Spur v. Tuberkulose
	11	Sofort	3+1+1+2+1	8	Nein	$\dagger_{34}$	Schwere exsudative Tuberkulose beider Lungen
	12	4. Tag	1+1+1	3	Nein	$\dagger_{32}$	
	13	9. Tag	1+2	3	Nein	$\dagger_{27}$	
II Infekt. 0,03 g iv.	14	—	—	—	—	$\dagger_{34}$	Schwere exsudative Tuberkulose beider Lungen
	15	—	—	—	Ja	$\dagger_{37}$	
	16	Sofort	3+3	6	Ja	$\dagger_{18}$	Ausgedehnte käsige Pneumonie. Käsige Knoten in der Milz
	17	Sofort	3+2	5	Nein	$\dagger_{28}$	Ausgedehnte käsige Pneumonie
	18	7. Tag	2+1+1+1	5	Ja	$\dagger_{44}$	Schwere Lungentuberkulose
	19	7. Tag	1+1	2	Ja	Lebt!	Get. 11 Mon. nach der Inf. Makrosk. frei von Tuberkulose
III Infekt. 0,03 g iv.	20	—	—	—	—	$\dagger_{19}$	Schwere exsudative Tuberkulose beider Lungen
	25	—	—	—	—	$\dagger_{20}$	
	27*)	—	—	—	—	Lebt!	2 Mon. nach der Inf. getötet. Sehr geringe Miliartuberkulose der Lungen. Zeichen alter pulm. Spontaninfekt.
	29*)	—	—	—	—	Lebt!	
	22	Sofort	1	1	Ja	Lebt!	Get. nach 2 Mon. Sehr geringe Lungentuberkulose
	24	Sofort	1+1	2	Ja	$\dagger_{32}$	Schwere Lungentuberkulose
	21	13. Tag	1+1	2	Ja	Lebt!	Get. nach 2 Mon. Disseminierte Miliartuberkulose der Lungen mäßig. Grades
	26	13. Tag	1	1	Ja	$\dagger_{19}$	Schwere exsudative Lungentuberkulose
	32	13. Tag	1+1	2	Ja	Lebt!	Get. nach 2 Mon. Dissemin. Miliartuberkulose der Lungen mäßigen Grades
	23	20. Tag	1+1	2	Ja	$\dagger_{30}$	Schwere Lungentuberkulose

überwanden die Infektion vermöge ihrer erworbenen Immunität. Es muß also die Möglichkeit zugegeben werden, daß das Resultat unserer Prüfung ganz anders ausgefallen wäre, wenn wir in den Versuchen 2 und 3 *eine größere Zahl von Kontrollen* eingestellt hätten; vielleicht hätten dann auch in diesen Versuchen einige besonders resistente Kontrollen die Infektion überlebt. Wir haben bestimmte Anhaltspunkte dafür, daß sich auch gegenüber der größeren Infektionsdosis von 3 cg die individuellen

*) Tuberkulinpositiv.

Verschiedenheiten der natürlichen Resistenz geltend gemacht haben. Bei Besprechung des Versuchs 3 haben wir darauf hingewiesen, daß wir hier während des Versuchs ein ursprünglich als Kontrolltier ausersehenes Kalb gegen ein anderes, das eigentlich zur Sanocrysinbehandlung ausersehen war, ausgetauscht haben, weil das letztere zur Zeit, als es behandelt werden sollte, bereits so schwer krank war, daß die Behandlung aussichtslos erschien. Somit ist in Versuch 3 eigentlich nur ein Kontrolltier als einwandfrei zu rechnen. Berücksichtigen wir die angeführten Gesichtspunkte, so kommen wir zu dem Ergebnis, daß unsere Kälberversuche eine *Heilwirkung des Sanocrysins in eindeutiger Weise nicht ergeben haben.*

Es bedarf nun wohl kaum der Erwähnung, daß Experimente mit einer nicht vollvirulenten Tuberkelbacillenkultur an Kälbern infolge der Notwendigkeit, zahlreiche Kontrollen zu verwenden, höchst kostspielig sind. Andererseits war nach den ungünstigen Berichten aus Amerika und England bei Verwendung maximal virulenter boviner Kulturen von vornherein ein Erfolg der Sanocrysinbehandlung nicht zu erwarten. Aus diesen Gründen haben wir von weiteren Experimenten an Kälbern abgesehen und noch 2 Versuche an Schafen angestellt.

Versuche an Schafen.

Ein Vorversuch an gesunden Schafen zeigte uns, daß das Sanocrysin für Schafe ziemlich toxisch ist. Von 3 mit 3,0, 1,0 und 0,5 cg Sanocrysin pro kg Körpergewicht iv. behandelten Schafen starben infolge der Giftwirkung 2 Tiere, und zwar das mit der größten und das mit der kleinsten Dosis behandelte, das erste nach einigen Tagen, das zweite erst nach $1^1/_2$ Wochen. Bei sämtlichen drei Tieren traten im Anschluß an die S-Injektion geringe Albuminurie und diffuse Hornhauttrübungen auf, letztere waren schon nach ca. 1 Woche wieder verschwunden.

Mit Rücksicht auf diese Beobachtung haben wir unsere tuberkuloseinfizierten Schafe fast durchweg mit *kleinen* Sanocrysindosen behandelt.

Versuch 1. 6 Schafe. Körpergewicht zwischen 30 und 40 kg. Die Tuberkulinprüfung (0,2 ccm Alttuberkulin 1 : 10 intracutan, 0,8 ccm 1 : 10 subcutan) ergab nur bei einem Tier (Schaf 37) eine nicht ganz einwandfrei negative Reaktion. Das Tier zeigte nämlich einen Temperaturanstieg nach der Tuberkulininjektion von 38,7° auf 39,8°. Die Hautreaktion war negativ. Dieses Schaf wurde von der Behandlung mit Sanocrysin ausgeschlossen und mit einem anderen (Schaf 30) zusammen als Kontrolle verwandt. Die Infektion geschah mit $^1/_{20}$ mg 3wöchiger Glycerinbouillonkultur unseres bovinen Stammes GA intravenös. Behandelt wurden Schaf 36, 33, 34 und 32. Schaf 36 erhielt $^1/_2$ Stunde nach der Infektion 1,0 cg Sanocrysin pro 1 kg Körpergewicht ohne Serum, später nichts mehr. Schaf 33 wurde erstmalig am 10. Tage mit 0,2 cg behandelt, dann am 17. Tage mit 0,05 cg und am 24. Tage mit 0,05 cg. Schaf 34 erhielt nur einmal am 10. Tage 0,2 cg. Schaf 32 bekam erstmalig nach 15 Tagen 0,05 cg Sanocrysin, am 23. Tage 0,05 und am 39. Tage nochmals 0,05 cg des Mittels. Mit Ausnahme des Schafes 36,

das sofort behandelt wurde, erhielten die Sanocrysintiere neben dem Goldpräparat Immunserum iv., gewöhnlich in einer Menge von 40 ccm, Schaf 32 nur Pferdeimmunserum, Schaf 33 nur Rinderserum, Schaf 34 einmal Rinderserum. Bei der Wiederholung der Sanocrysinseruminjektion trat, offenbar weil das Serum der gleichen Tierart wieder verwandt wurde, sehr starke Dyspnöe auf, manchmal verbunden mit hohem Anstieg der Körpertemperatur.

Der Verlauf der Infektion bei dem Kontrollschaf, das die zweifelhafte Tuberkulinreaktion aufwies, war folgender: Vom 12. Tage post inf. beginnende, nur 1 Woche währende Fieberperiode. Nach dieser Zeit Temperatur dauernd normal. Nach geringer anfänglicher Gewichtsabnahme Gewichtsstillstand, später Zunahme. 50 Tage nach der Infektion getötet, zeigt es Miliartuberkulose der Lungen mäßiger Ausdehnung, die aber, wie besonders aus der unregelmäßig zackigen Begrenzung zahlreicher Knötchen hervorgeht, in Ausheilung begriffen ist. In einer kirschgroßen Mesenterialdrüse zahlreiche, teils nur verkäste, teils verkalkte Tuberkel. Wir möchten annehmen, daß es sich hier um die Residuen einer alten Spontaninfektion des Verdauungstraktus handelt. Daraus würde sich die zweifelhafte Tuberkulinreaktion und vor allem die auffallende Resistenz gegenüber der experimentellen Infektion erklären lassen. Ganz anders war der Krankheitsverlauf bei dem zweiten — einwandfrei tuberkulinnegativen Kontrolltier (Schaf 30). Am 14. Tage nach der Infektion stellte sich Fieber ein, das nun bis zum Tode des Tieres nach 68 Tagen anhält. Dauernder Gewichtsrückgang (Verlust i. g. 13 kg). Seit dem 34. Tage nach der Infektion Dyspnöe, die ständig zunimmt. Bei der Sektion zeigten sich beide Lungen von miliaren grauen bis graugelblichen runden Knötchen völlig durchsetzt. Käsige und teilweise verkalte submiliare Herde in den mächtig geschwollenen Tracheal-, Bronchial- und Mediastinallymphknoten. In Leber und Nieren einzelne miliare Tuberkel. Die übrigen Organe o. B.

Von den 4 behandelten Schafen überlebten 3 die Infektion. Das vierte, Schaf 34, starb 45 Tage post infectionem. Bei der Sektion fand sich eine schwere disseminierte Tuberkulose beider Lungen und ihrer Lymphknoten.

Schaf 36, das Tier, das unmittelbar nach der Infektion Sanocrysin erhalten hatte, und zwar in hoher Dosis (1 cg pro kg), später nicht weiter behandelt wurde, zeigte auffallenderweise schon 1 Woche nach der Injektion — also eine Woche früher als die tuberkulinnegative Kontrolle (Schaf 30), eine mehrere Tage dauernde Temperaturerhöhung (Gipfel bei 41,1°), von 15—30 Tage eine zweite längere Fieberperiode. Während dieser Zeit sank das Gewicht von 35 auf 31 kg ab, im 2. Monat nach der Infektion erholte sich das Tier allmählich, das Körpergewicht erreichte bald die alte Höhe, blieb dann während der weiteren Behandlung annähernd gleich. Auch das Schaf 33 begann bereits nach 7 Tagen zu fiebern, die Temperatur wurde erst 50 Tage post infec-

tionem wieder normal, damit trat eine erhebliche Besserung des Allgemeinbefindens ein; das Körpergewicht, anfänglich um ein geringes vermindert, nahm dann mehr und mehr zu. Schaf 32 machte eine, vom 14. Tage an beginnende, etwas über vierwöchige Periode unregelmäßigen Fieberns durch, während deren ein geringer Gewichtsverlust eintrat. Nach Ablauf des Fiebers Gewichtszunahme, Besserung des Allgemeinzustandes. Die beiden letzterwähnten Schafe wurden 70 Tage nach der Infektion, das Schaf 36 nach 10 Monaten, in vollauf befriedigendem Gesundheitszustand getötet. Die Sektion ergab folgendes:

Schaf 32. In beiden Lungen sehr zahlreiche submiliare bis über miliare stellenweise konfluierende graue glasige Herde von überwiegend runder Form. Tracheal-, Bronchial- und Mediastinal-Lymphknoten geschwollen mit einzelnen käsigen, teilweise verkalkten, stecknadelkopfgroßen Herden. Einzelne miliare Tuberkel in der Rinde beider Nieren.

Der Befund bei Schaf 33 war sehr ähnlich. Nur waren die Knötchen in den ventralen Abschnitten beider Lungen größtenteils nicht rund, sondern von zackiger Begrenzung.

Zeichen einer alten Spontaninfektion fanden sich bei diesen beiden Schafen nicht. Die Verkalkung in den Lymphknoten der Lungen kann wohl auf die durch die experimentelle Infektion vor 7 Wochen gesetzten tuberkulösen Veränderungen bezogen werden. Wir fanden eine Verkalkung tuberkulöser Drüsenherde bei Kälbern und Schafen häufig schon 2 Monate nach der Infektion. Ganz auszuschließen ist natürlich nicht, daß bei den Tieren eine pulmonale Spontaninfektion bestanden hat.

Bei Schaf 36 fanden sich, trotzdem so lange Zeit nach der Infektion verstrichen war, noch sehr zahlreiche Knötchen in beiden Lungen, teilweise rund, teilweise von unregelmäßiger Begrenzung und vielfach über das Niveau der Lungenoberfläche erhaben, zahlreiche verkalkte Herde in den Tracheobronchial- und Mediastinaldrüsen. In der Halsgegend pflaumengroßer käsig kalkiger Herd.

Der Versuch spricht für eine Heilwirkung der Behandlung; welchen Anteil die Seruminjektionen an dem Erfolg haben, ist allerdings nicht abzuschätzen. Sehr beachtenswert schien uns, daß ein Schaf die Tuberkulose klinisch überwunden hat, welches Sanocrysin ohne Serum erhielt (Schaf 36). Der Versuch berechtigte zu gewissen Hoffnungen, und wir haben zu seiner Ergänzung deshalb einen neuen wesentlich größeren Versuch an Schafen angestellt.

Versuch 2. 25 Schafe. Körpergewicht in der Hauptsache zwischen 30 und 40 kg. Auf das Resultat war das Körpergewicht übrigens nachweislich nicht von Einfluß. Sämtliche 25 Schafe hatten sich bei der Tuberkulinprüfung als tuberkulinnegativ erwiesen. Die intravenöse Injektion von $^1/_{20}$ mg 12tägiger Kultur GA in 5 ccm ging bei allen Tieren glatt, nur bei Schaf 55 floß 1—2 ccm vorbei. Dieses Tier, das also nicht $^1/_{20}$, sondern nur $^1/_{30}$ mg oder noch weniger erhalten hat, wurde mit als Kontrolle eingestellt. Neben dem Schaf 55 dienten noch 5 weitere Schafe als Kontrolle (Nr. 76, 70, 71, 72 und 73). 3 Schafe haben wir nur mit *Serum* behandelt. Wir wollten auf diese Weise über die Wirkung des Serums auf den Verlauf der Infektion eine Vorstellung gewinnen. Schaf 67 erhielt mehrmals, und zwar am 9., 17., 28. und 43. Tage post infectionem Immunpferdeserum Kopenhagen, Schaf 68 neben Immunpferdeserum Normalserum, Schaf 69 nur Normal-

serum. Bei Schaf 68 wurden die Injektionen wie folgt vorgenommen: Am 13., 15., 20. und 28. Tage je 40 ccm Pferdeimmunserum, am 36. Tag 40 ccm Normalpferdeserum (nicht inaktiviert). Schaf 69 erhielt nur 3 mal nicht inaktiviertes Normalpferdeserum, und zwar am 13., 20. und 36. Tage. Bei den letzten Seruminjektionen erhielten die Tiere 24 Stunden vor der iv. Einspritzung 20 ccm Serum subcutan; hierdurch wurde die anaphylaktische Reaktion abgeschwächt. Die Tiere gerieten aber trotzdem in eine mehrere Stunden anhaltende starke Dyspnöe.

Es sollen nun die mit *Sanocrysin* behandelten Schafe kurz besprochen werden.

4 Schafe erhielten sofort, d. h. etwa $^1/_2$ Stunde nach der Infektion Sanocrysin ohne Serum, und zwar Schaf 51 und 52 1,0 cg pro 1 kg Körpergewicht, Schaf 53 0,5 und Schaf 54 0,2 cg. Weitere Injektionen wurden diesen Tieren nicht zuteil. Bei den übrigen 12 Schafen wurde die Behandlung am 9. bzw. 13. Tag nach der Infektion begonnen und dann noch 1—2 mal wiederholt.

Schaf 56 erhielt am 9. Tage 0,005 cg, am 15. Tage 0,05 und am 28. Tage nochmals 0,05 cg, Schaf 57 am 13. Tage 0,05, am 20. Tage 0,05 und am 28. Tage 0,05 cg, Schaf 59 nur 2 mal 0,05 cg, und zwar am 13. und am 20. Tage, sämtliche 3 Schafe ohne Immunserum.

Schaf 60 bekam am 9. Tage 0,005 cg, am 14. und 28. Tage je 0,05 cg pro Kilogramm, Schaf 61 an den gleichen Tagen je 0,05 cg, beide Tiere gleichzeitig Pferdeimmunserum Kopenhagen.

Schaf 62 erhielt 0,2 cg am 9. Tage, 0,05 cg am 17. und 0,05 cg am 28. Tage, Schaf 63 0,2 cg am 13., 0,05 cg am 19. und 28. Tage, Schaf 64 die gleiche Behandlung wie Schaf 63 nur ohne die letzte Injektion. Die 3 Schafe 62, 63 und 64 erhielten kein Pferdeimmunserum.

Schaf 65 wurde behandelt wie Schaf 63, Schaf 66 wie Schaf 64, nur mit dem Unterschied, daß die beiden Schafe 65 und 66 mit Sanocrysin gleichzeitig Pferdeimmunserum erhielten. Die Schafe 74 und 75 erhielten 2 mal und, zwar im Abstand von 1 Woche 0,2 cg Sanocrysin mit Serum, Schaf 74 erstmalig am 9. Tage, Schaf 75 erstmalig am 13. Tage.

Die Sanocrysininjektionen hatten, abgesehen von den beiden Schafen, welche 1 cg sofort erhielten und die mit einer leichten Albuminurie antworteten, bei keinem der behandelten Tiere eine nachweisliche Schädigung *unmittelbar* zur Folge. Allerdings haben wir den Urin der Tiere nur in Stichproben untersuchen können.

Um etwaige durch Sedimentation der Bacillen in der Aufschwemmung bei der intravenösen Infektion entstehende Versuchsfehler möglichst auszuschalten, haben wir zunächst einige Kontrollen infiziert, dann die zur Behandlung bestimmten Tiere, zum Schluß wieder einige Kontrolltiere. Es sei schon hier bemerkt, daß die Reihenfolge der Impfung, trotzdem diese fast 2 Stunden dauerte, auf den Erfolg der Infektion einen nachweislichen Einfluß nicht gehabt hat.

Der Verlauf des zweiten Schafversuches war folgender:

Sämtliche Schafe, die überhaupt nicht behandelt waren, verendeten zwischen 29 und 74 Tagen an schwerer disseminierter Lungentuberkulose. Nur das Schaf 55, bei dem nachgewiesenermaßen nicht die volle Infektionsdosis zur Verimpfung gelangt war, überlebte die Infektion wahrscheinlich *wegen* der nicht genug zureichenden Infektionsdosis, es ist aber nicht auszuschließen, daß es sich in diesem Fall um die Auswirkung einer besonders hohen individuellen Resistenz der Tuberkulose gegenüber handelt. Daß zwischen den Schafen gleichen Gewichts Resistenzverschiedenheiten in der Tat bestehen, darauf deutet ja schon der erhebliche Unter-

schied in der Krankheitsdauer bei den 5 Kontrollen hin. *Sämtliche 3 nur mit Serum behandelten Schafe überlebten.* Dagegen überstand von 16 mit Sanocrysin behandelten Tieren nur eins (Schaf 66) die Infektion. Dieses Tier hatte aber mit Sanocrysin Immunserum erhalten, so daß hier vielleicht die Serumbehandlung entscheidend gewesen ist. *Von den 10 nur mit Sanocrysin behandelten Tieren ist kein einziges mit dem Leben davongekommen!*

Sehen wir von den beiden Schafen 74 und 75 ab, welche verhältnismäßig hohe Sanocrysindosen bekommen haben, so tritt ein Unterschied im *Verlauf der Tuberkulose* zwischen denjenigen Tieren, die nur Sanocrysin und denjenigen, die daneben noch Immunserum erhalten haben und den unbehandelten Kontrollen hervor. Die nur mit Sanocrysin behandelten Schafe verendeten nach durchschnittlich 50 Tagen, die gleichzeitig mit Serum behandelten nach 65 und die Kontrollen nach 55 Tagen. Der durchschnittliche Gewichtsverlust, den die Tiere innerhalb von 4 Wochen unserer Infektion erlitten, ist für die drei Gruppen deutlich verschieden. Gruppe I 6,9 kg, Gruppe II 4,8 kg, Gruppe III (Kontrolle) nur 2,8 kg. Es kann hiernach wohl kaum zweifelhaft sein, daß in unserem zweiten Schafversuch *die Sanocrysinbehandlung nicht nur keinen Nutzen gehabt, sondern sogar auf den Verlauf der Erkrankung ungünstig eingewirkt hat.* In bezug auf den Temperaturverlauf war zwischen unbehandelten und behandelten Tieren ein bemerkenswerter Unterschied nicht vorhanden. Nach einer etwa 5 Tage nach der Infektion beginnenden initialen Periode *mäßiger Temperaturerhöhung* setzte bei allen Schafen fast am gleichen Tage, nämlich zwischen dem 10. und 12. Tage nach der experimentellen Infektion *hohes Fieber* ein, das wochenlang anhielt (Temperaturen zwischen 41 und 42°), dann kurz vor dem Tode der Tiere einen remittierenden Typus zeigte, bei den überlebenden Tieren allmählich in das afebrile Stadium überging.

Was den Sektionsbefund bei den spontan verendeten Schafen betrifft, so war auch in dieser Hinsicht zwischen den Kontrollen und den mit Sanocrysin behandelten Schafen ein Unterschied nicht nachweisbar. Es bestand bei allen verendeten Tieren eine schwere disseminierte Miliartuberkulose der Lungen. Der Befund an den übrigen Organen trat an Bedeutung gegenüber dem Lungenbefund so stark zurück, daß wir glauben, von seiner Schilderung ganz absehen zu dürfen.

Sehr auffallend war nun die Beobachtung, daß *sämtliche 3 nur mit Serum behandelte Schafe die Infektion überstanden.* Am günstigsten gestaltete sich der Verlauf der Infektion sogar bei dem Schaf 69, *das nur Normalserum erhalten hatte.* Dieses Tier zeigte während seiner Krankheit nicht nur keinen Gewichtsverlust — der Gewichtsverlust war auch bei den beiden anderen Tieren nur ganz unbedeutend —, es nahm sogar an Körpergewicht zu!

Wir haben nun 2 der 5 überlebenden Schafe, und zwar Schaf 55 (unbehandelte Kontrolle) und Schaf 68 (mit Immunserum und Normalserum behandeltes Tier) bei befriedigendem Gesundheitszustand 3 Monate post infectionem getötet. Der Befund war folgender:

Schaf 55. Beide Lungen von miliaren bis über pfennigstückgroßen tuberkulösen Herden völlig durchsetzt. Die Herde sind überwiegend grau und durchscheinend, die größeren — offenbar durch Konfluieren kleinerer Tuberkel entstandenen Herde an den dorsalen Abschnitten der Lungen zeigen zentrale Verkäsung. In den tracheobronchialen Lymphknoten zahlreiche stecknadelkopfgroße graue bis graugelbliche Herde. In den Nieren mäßig viel miliare Rindentuberkel.

Schaf 68. In beiden Lungen zahlreiche miliare und linsengroße vielfach zu pfennigstückgroßen Herden konfluierte Tuberkel, von teilweise unregelmäßiger, zackiger Begrenzung. Die stärkste Entwicklung der tuberkulösen Herde auch hier in den dorsalen Abschnitten der Lungen. Die Herde stehen weniger dicht wie bei dem Schaf 55. In den Tracheobronchial- und Mediastinal-Lymphknoten mäßig viel miliare graue Knötchen. Mäßig zahlreiche miliare Tuberkel der Nierenrinde beiderseits.

Die Schafe 67 und 69 und das mit Sanocrysin *und* Serum behandelte Schaf 66 wurden bei befriedigendem Allgemeinzustand 7 Monate nach der Infektion getötet und zeigten folgenden pathologisch-anatomischen Befund:

Schaf 66. Beide Lungen von zahlreichen bis stecknadelkopfgroßen vorwiegend runden Tuberkeln durchsetzt. Ausgedehnte Pleuraschwielen an den dorsalen Abschnitten der Lungen. Reichlich verkalkte über hirsekorngroße Herde in den Tracheobronchial- und Mediastinaldrüsen, in geringerer Anzahl auch in den übrigen Lymphknoten des Körpers. Reichlich miliare Tuberkel in den Nieren. Verkalkte Milztuberkel.

Schaf 67. In beiden Lungen spärliche miliare und kleinere graue Knötchen von vorwiegend unregelmäßig zackiger Begrenzung. Mehrere verkalkte Herde in den großen Lymphknoten der Lungen und des Mittelfellraums. Einzelne Miliartuberkel in Milz und Nieren.

Schaf 69. In beiden Lungen mäßig zahlreiche, hauptsächlich miliare Tuberkel von unregelmäßiger Gestalt. Geringe Pleuraschwielen, besonders dorsal. Mehrere verkalkte miliare Tuberkel in den Tracheobronchial- und Mediastinallymphdrüsen. Einzelne verkalkte Miliartuberkel der Milz, spärliche Miliartuberkel der Nieren.

Wir müssen wohl für alle diese 5 Schafe annehmen, daß die Tuberkulose bei ihnen stationär geworden ist mit einer mehr oder weniger deutlichen Tendenz zur Heilung. Die anatomischen Befunde sind bei Schaf 55 und 66 noch erhebliche; das fällt besonders bei dem mit Sanocrysin und Serum behandelten Schaf 66 auf, weil hier die Tötung von der Infektion und Erkrankung um viele Monate getrennt ist. Der günstige anatomische Befund bei den beiden Serumtieren Schaf 67 und Schaf 69 ist recht beachtenswert.

Die Ergebnisse des Versuches 1 und 2 sind in der nachfolgenden Tabelle noch einmal kurz zusammengestellt.

Tabelle 9. *Sanocrysinversuche an Schafen.*
Infektion $^1/_{20}$ mg iv.

Versuch Nr.	Nr. der Schafe	Sanocrysinbehandlung: Beginn der Behandlung	Einzelgaben in cg pro 1 kg Körpergewicht	ig. cg	Immunserum		Erfolg
I	30	—	—	—	—	†$_{68}$	Schwere, disseminierte Miliartuberkulose der Lungen
	37	—	—	—	—	Lebt!	Get. nach 50 Tg. Miliartbc. der Lungen mäßigen Grades. Alte Mesenterialdrüsentbc.
	36	Sofort	1,0	1,0	Nein	Lebt!	Get. nach 10 Mon. Ausgedehnte Miliartbc. der Lungen
	33	10. Tag	0,2+0.05+0.05	0,3	Ja	Lebt!	Get. nach 70 Tg. Miliartbc. der Lungen mäßig hohen Grades
	34	10. Tag	0,2	0.2	Ja	†$_{45}$	Schwere, disseminierte Lungentuberkulose
	32	15. Tag	0,05+0,05+0,05	0,15	Ja	Lebt!	Get. nach 70 Tg. Miliartbc. der Lungen mäßig hohen Grades
II	55	—	—	—	—	Lebt!	Get. nach 3 Mon. Mäßig schwere, dissem. Miliartbc. der Lungen
	76	—	—	—	—	†$_{67}$	Schwere, disseminierte Miliartuberkulose der Lungen
	70	—	—	—	—	†$_{48}$	
	71	—	—	—	—	†$_{74}$	
	72	—	—	—	—	†$_{56}$	
	73	—	—	—	—	†$_{29}$	
	67	—	—	—	Ja	Lebt!	Get. nach 7 Mon. Sehr geringe Miliartbc. der Lungen
	68	—	—	—	Ja	Lebt!	Get. nach 3 Mon. Mäßig ausgedehnte Miliartbc. der Lungen
	69	—	—	—	N. Ser.	Lebt!	Get. nach 7 Mon. Sehr geringe Miliartbc. der Lungen
	51	Sofort	1,0	1,0	Nein	†$_{71}$	Schwere, disseminierte Miliartuberkulose der Lungen
	52	Sofort	1,0	1,0	Nein	†$_{47}$	
	53	Sofort	0,5	0,5	Nein	†$_{54}$	
	54	Sofort	0,2	0,2	Nein	†$_{40}$	
	56	9. Tag	0,005+0,05+0,05	0,105	Nein	†$_{37}$	
	57	13. Tag	0,05+0,05+0,05	0,15	Nein	†$_{63}$	
	59	13. Tag	0,05+0,05	0,1	Nein	†$_{51}$	
	60	9. Tag	0,005+0,05+0,05	0,105	Ja	†$_{69}$	
	61	13. Tag	0,05+0,05+0,05	0,15	Ja	†$_{73}$	
	62	9. Tag	0,2+0,05+0,05	0,3	Nein	†$_{37}$	
	63	13. Tag	0,2+0,05+0,05	0,3	Nein	†$_{43}$	
	64	13. Tag	0,2+0,05	0,25	Nein	†$_{55}$	
	65	9. Tag	0,2+0,05+0,05	0,3	Ja	†$_{53}$	
	66	13. Tag	0,2+0,05	0,25	Ja	Lebt!	Get. nach 7 Mon. Ausgedehnte Miliartbc. der Lungen
	74	9. Tag	0,2+0,2	0,4	Ja	†$_{33}$	Schwere, disseminierte Lungentuberkulose
	75	13. Tag	0,2+0,2	0,4	Ja	†$_{47}$	

Aus den Versuchen an Schafen kann nur der Schluß gezogen werden, daß unter den von uns geprüften Bedingungen *die Behandlung einer nicht schweren Tuberkuloseinfektion der Schafe mit Sanocrysin ohne Erfolg* gewesen ist.

Dagegen hat augenscheinlich die Behandlung mit Serum und zwar mit Immunserum wie auch mit Normalpferdeserum auf den Verlauf der Tuberkulose einen günstigen Einfluß gehabt. Mit Rücksicht auf die individuellen Verschiedenheiten der natürlichen Resistenz, auf die wir oben hingewiesen haben, ist es wohl möglich, daß dieser scheinbare Erfolg auf Zufall beruht.

Versuche durch Behandlung mit Normalserum die experimentelle Tuberkulose von Schafen zu beeinflussen, werden z. Zt. von dem einen von uns (*Lange*) fortgesetzt. Bis heute läßt sich ein endgültiges Urteil über den Erfolg dieser Behandlung nicht abgeben.

Ergebnisse.

Die von *Möllgaard* als entwicklungshemmend für Tuberkelbacillen angegebene Konzentration von 1:100000 Sanocrysin konnte für bestimmte Stämme bestätigt werden. Wie auch dänische Autoren (*O. Bang, Madsen*) fanden, kann die entwicklungshemmende Konzentration für andere Tuberkelbacillenstämme weitgehend wechseln, nach *Madsen* bis auf 1 : 25 (!) herabgehen. Eine bactericide Wirkung haben wir, wie auch *Möllgaard* bei einer Konzentration von 1 : 1000 innerhalb von 24 Stunden fast völlig vermißt. Unsere Versuche an Meerschweinchen und Kaninchen ergaben keine Heilwirkung des Sanocrysins.

Was die Versuche an großen Tieren betrifft, auf Grund deren *Möllgaard* eine spezifische Heilwirkung des Sanocrysins auf die Tuberkulose angenommen hat, *so geben unseres Erachtens weder seine Rinderversuche noch unsere an Kälbern und Schafen angestellten Versuche Beweise dafür.* Die von *Möllgaard* benutzten Perlsuchtkulturen waren recht schwach virulent, und auch die von uns benutzte Kultur war, wie der Vergleich mit zahlreichen früheren Versuchen an Rindern lehrt, keineswegs hochvirulent, wenn auch die Infektion bei unseren Kälbern schwerer verlief als bei denen von *Möllgaard.* Von der Schwere der Infektion ist aber, wie sich das auch bei chemotherapeutischen Versuchen mit anderen Mitteln gezeigt hat, die Empfindlichkeit der Tiere gegen Sanocrysin weitgehend abhängig; aus diesem Grunde haben wir wesentlich kleinere Dosen des Mittels gegeben wie *Möllgaard.*

An sich mag die Verwendung schwacher Infektionen zu derartigen Versuchen berechtigt und zweckmäßig sein; da aber dabei, wie sich bei *Möllgaards* und unseren Versuchen gezeigt hat, auch die Kontrolltiere nicht sicher tödlich infiziert werden, sondern spontan die Infektion überwinden können, so treten unter solchen Bedingungen *individuelle*

Unterschiede in der normalen Resistenz der Tiere stark in den Vordergrund. Dadurch ist die Beurteilung der Ergebnisse sehr erschwert. Wir halten es für wahrscheinlich, daß es in der Hauptsache auf diese Momente zurückzuführen ist, wenn sich in einzelnen Versuchen sowohl von *Möllgaard* wie von uns ein Erfolg der Sanocrysinbehandlung zu zeigen schien.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Bang, Oluf,* Zeitschr. f. Tuberkul. **45**, 122. 1926. — [2]) *Bruck* und *Glück,* Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 57. — [3]) *Deist, H.,* Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **62**, 658. 1926. — [4]) *Feldt, A.,* Dtsch. med. Wochenschr. 1913, S. 549. — [5]) *Feldt, A.,* Berl. klin. Wochenschr. 1917, S. 1111. — [6]) *Geinitz* und *Unger-Laisle,* Dtsch. med. Wochenschr. 1917, S. 527. — [7]) *Madsen, Th.,* und *Mörch,* The Measuring of Antitubercle Serum for the Sanocrysin Treatment. Kopenhagen 1925. — [8]) *Möllgaard, Holger,* Chemotherapy of Tuberculosis. Kopenhagen 1924. — [9]) *Spiess* und *Feldt,* Dtsch. med. Wochenschr. 1914, S. 579. — [10]) *De Witt, Cadwell* und *Leavell* s. *Wells, De Witt* und *Long,* Chemistry of Tuberculosis, Baltimore 1923.

(Aus der II. medizinischen Klinik der Charité — Geheimrat *Fr. Kraus* — und der Seuchenabteilung des Institutes „Robert Koch" — Prof. *Br. Lange.*)

Die prophylaktische und therapeutische Wirkung von Helpin auf die experimentelle Meerschweinchentuberkulose[1]).

Von

R. Freund und **I. Magat.**

Bekanntlich spielen Lipoide bei Immunitätsvorgängen eine wichtige Rolle. Mit Rücksicht hierauf und auf die günstigen Erfahrungen der parenteralen Lipoidtherapie in Form von Helpin, einer durch ein bestimmtes Elektrolytensystem stabilisierten Glycerinemulsion von Lecithin, auf verschiedene Funktionen des Körpers[2]) schienen uns Untersuchungen darüber von Interesse, welchen Einfluß eine Speicherung von Helpin im Organismus *auf den Ablauf der experimentellen Meerschweinchentuberkulose* ausübt. Wir glaubten keineswegs, durch die prophylaktische oder therapeutische Zufuhr von Lipoiden eine tuberkulöse Erkrankung der Tiere *verhindern* bzw. heilen zu können; vielleicht ließ sich aber doch bei geeigneter Versuchsanordnung bis zu einem gewissen Grade ein günstiger *Einfluß auf den Krankheitsverlauf* nachweisen.

Versuchsanordnung.

Zu den Versuchen dienten uns Meerschweinchen von ungefähr gleichem Alter und Gewicht, die alle unter gleichen äußeren Bedingungen gehalten wurden. Was die Infektion mit Tuberkelbacillen betrifft, so kam alles darauf an, einen Infektionsmodus zu finden, der *einerseits regelmäßig zur Tuberkulose der Tiere führte, andererseits eine so milde Erkrankung setzte, daß selbst schwächere Schutz- oder Heilwirkungen im Verlauf der Tuberkulose noch zum Ausdruck kommen konnten.*

Nun hatten *B. Lange*, *Freund* und *Jochimsen* in Untersuchungen über die Schutzwirkung abgetöteter Tuberkelbacillen an Meerschweinchen, die demnächst ausführlich mitgeteilt werden sollen, die Erfahrung gemacht, daß es mehrfach gelingt, die offenbar recht schwache, durch abgetötete Bacillen erzeugte Resistenzsteigerung nachzuweisen, wenn die Tiere mit *kleinsten Bacillenmengen* ($^1/_{1\,000\,000}$—$^1/_{10\,000\,000}$ mg) *intracutan* infiziert werden.

[1]) Die Versuche sind teilweise mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft ausgeführt worden.

[2]) Literatur siehe *Magat.*

Bei Tieren, die ohne Vorbehandlung in dieser Weise infiziert werden, bildet sich in der Regel nach etwa 3 Wochen an der Impfstelle ein *Primäraffekt der Haut*. Er erscheint plötzlich, gut linsengroß, ulceriert gewöhnlich bald und bleibt oft bis zum Tode nachweisbar. Annähernd gleichzeitig, einmal früher, einmal später, werden die geschwollenen cubitalen Lymphknoten der Impfseite fühlbar. Tötet man die Tiere nach 4 Wochen, so ist fast immer die Tuberkulose noch beschränkt auf die regionäre Cubitaldrüse, nur die Portaldrüse zeigt dann schon beginnende Schwellung und Verhärtung, die Milzschwellung ist äußerst gering oder fehlt ganz. Erst nach 2 Monaten pflegt eine stärkere Milzschwellung nachweisbar zu sein; etwa von dieser Zeit an trifft man auch *Metastasen in den Lungen*. Die Leber pflegt viel später zu erkranken. Die örtlichen Lymphknoten sind nach 2 Monaten fast regelmäßig verkäst.

Es gibt nun *Abweichungen* von dem typischen Bild, die einerseits bedingt sind durch gewisse, auch bei sorgfältiger Technik nicht vermeidbare Unregelmäßigkeiten der experimentellen Infektion (ungleiche Zahl der verimpften Bacillen!), andererseits durch Verschiedenheiten der individuellen natürlichen Resistenz der Meerschweinchen. So kommt es vor, daß der Primäraffekt der Haut ausbleibt bzw. nur angedeutet oder erst spät zur Entwicklung kommt. Dies um so eher, je kleiner die verimpfte Bacillenmenge ist, z. B. wenn sie unter 100 beträgt. Die Verimpfung von $^1/_{1\,000\,000}$ mg (ca. 100 Bacillen) hat noch so gut wie regelmäßig bei unserer Kultur einen typischen Primäraffekt zur Folge. Auch der Zeitpunkt und die Ausdehnung der Metastasen in den inneren Organen unterliegt gewissen von der individuellen Widerstandsfähigkeit und von Zufälligkeiten abhängenden Schwankungen.

Hiernach muß auf den ersten Blick die Beurteilung sehr schwacher Wirkungen von Heil- oder Schutzmitteln auf den Krankheitsverlauf unter den gewählten Bedingungen schwierig, ja fast unmöglich erscheinen. Dem ist aber nicht so. Man muß nur eine genügende Zahl von Versuchen anstellen und eine ausreichende Zahl von Kontrollen infizieren.

Unter solchen Bedingungen konnte in den oben erwähnten Immunisierungsversuchen mit abgetöteten Bacillen festgestellt werden, daß die vorbehandelten Tiere, verglichen mit den Kontrollen, bei bestimmtem Behandlungsmodus mehrfach eine leichtere Erkrankung durchmachten als die nicht behandelten Tiere. Im besonderen fehlte der Primäraffekt bei den vorbehandelten Tieren viel häufiger als bei den Kontrollen. Es soll hier nicht auf die Bedeutung dieser Experimente für die Praxis eingegangen, sondern *lediglich die Tatsache hervorgehoben werden, daß bei der beschriebenen Infektionsart eine durch die Vorbehandlung bedingte Veränderung der Reaktionsweise des Körpers dem Tuberkelbacillus gegenüber überhaupt nachgewiesen werden konnte.*

Solche Erfahrungen ermutigten uns, die gleiche Versuchsanordnung bei der Prüfung der Helpinwirkung anzuwenden.

Dementsprechend geschah die Infektion mit $^1/_{1\,000\,000}$ und $^1/_{10\,000\,000}$ mg unseres bovinen Stammes G.A. intracutan am rechten Hinterschenkel. In unseren Versuchen wurden zur Kontrolle außerdem noch einige Meerschweinchen mit $^1/_{100\,000\,000}$ mg infiziert. Die mit der letztgenannten Dosis geimpften Tiere der Versuche 1 und 2 (in den Tabellen nicht mit aufgeführt) blieben gesund. In diesen Versuchen ist also $^1/_{10\,000\,000}$ mg *die kleinste noch infizierende Bacillenmenge.* Im Versuch 3 lag die Grenze dagegen bei $^1/_{100\,000\,000}$ mg (2 von 4 Tieren positiv).

Was nun die Behandlung mit Helpin anbelangt, so hatten wir für die optimalen Dosen zur Prophylaxe oder Therapie der experimentellen Meerschweinchentuberkulose keinerlei Anhaltspunkte. Infolgedessen mußten wir die einzelnen Gruppen wieder unterteilen. Ein Teil der Tiere wurde vor und nach der Infektion behandelt, ein anderer Teil wurde erst unmittelbar nach der Infektion in Behandlung genommen. Heilversuche mit Behandlungsbeginn nach Manifestwerden der Krankheit wurden nicht vorgenommen. Die Behandlungsmethode (Applikationsart und Dosierung) geht aus den Tab. 1 und 2 hervor.

Im Versuch 1 (Tab. 1) wurde als Maximaldosis pro die nicht mehr als 1,5 ccm Helpin gegeben (mit Ausnahme von Nr. 1214, das pro dosi bis 3,0 ccm erhielt). Im Versuch 2 (Tab. 2) wurde bis 3 ccm Helpin injiziert, im 3. Versuch endlich noch größere Dosen. Die Behandlung geschah jeden 2. Tag, die Tiere wurden regelmäßig alle 2—3 Tage auf Auftreten eines Primäraffektes, Schwellung der regionären Drüsen usw. untersucht. Leider gingen in der 1. Versuchsreihe mehrere Tiere vorzeitig an Pneumokokkensepsis ein. Bei diesen wird die Beurteilung in gewissem Grade erschwert; denn es ist eine Beeinflussung der Tuberkulose durch die interkurrente Infektion keineswegs auszuschließen. Wir haben die Tiere nun, soweit sie nicht spontan verendeten, nach 2—3 Monaten getötet. Dieser Zeitpunkt schien uns mit Rücksicht auf unsere Fragestellung am günstigsten. Der Sektionsbefund, bei dem es uns auf den Befund an den Drüsen, an Milz, Leber und Lunge besonders ankam, ist in den Spalten 9—12 mit quantitativen Angaben vermerkt. Die Befunde an den verschieden gelegenen Drüsen sind aus äußeren Gründen zusammengefaßt angegeben.

Mitteilung der Versuche.

Über das Ergebnis unserer Versuche soll im folgenden kurz berichtet werden.

Wie aus der Tab. 1 hervorgeht, entwickelte sich bei den 3 unbehandelten Kontrolltieren der mit $^1/_{1\,000\,000}$ mg infizierten Serie der Primäraffekt zwischen dem 19. und 24. Tag post inf. Bei 3 ante und post inf. weiter

Tabelle 1.

Vor- und Nachbehandlung bzw. nur Nachbehandlung mit kleinen Dosen Helpin.

Infektion Millionstel mg	Behandlung mit Helpin in ccm	Primäraffekt	Lymphdrüsen	Größe der region. Lymphdrüsen nach 30 Tagen	Größe der region. Lymphdrüsen nach 60 Tagen	† spontan gestorben × getötet Tage post inf.	Grad der Tuberkulose beim Sektionsbefund: Lymphknoten	Milz	Leber	Lunge
1/1	vorbeh.: 9×0,2 ic. nachbeh.: 12×0,4 ic. 14×1,0 ic.	$+_{24}$	$+_{24}$	++!	++!	$\times_{87}$	+	0	0	0
1/1	vorbeh.: 9×0,2 ic. nachbeh.: 12×0,4 ic. 14×1,0 ic.	$+_{24}$	$+_{24}$	+!	·	$\dagger_{30}$	+	0	0	0
1/1	vorbeh.: 9×0,2 ic. nachbeh.: 12×0,4 ic. 14×1,0 ic.	$+_{24}$	$+_{24}$	++!	+++!	$\times_{103}$	+++	+	0	+
1/1	nachbeh.: 13×0,4 ic. 14×1,5 ip.	0	$+_{31}$	++!	+++	$\times_{103}$	++	++	0	++
1/1	nachbeh.: 13×0,4 ic. 2×1,5 ip.	0_{30}	$+_{23}$	++	·	$\dagger_{30}$	+	0	0	0
1/1	nachbeh.: 13×0,4 ic. 14×1,5 ip.	$+_{24}$	$+_{24}$	++	+++!	$\times_{75}$	+	0	0	0
1/1	nachbeh.: 13×0,4 ic. 14×1,5 ip.	0	$+_{31}$	++	+	$\dagger_{50}$	+	0	0	0
1/1	nachbeh.: 13×0,4 ic. 14×1,5 ip.	$+_{32}$	$+_{31}$	+!	++	$\times_{87}$	+	0	0	0
1/1	nachbeh.: 13×0,4 sc. 18×3,0 ip.	$+_{24}$	$+_{24}$	++	+++!	$\times_{103}$	+++	+	0	+
1/1	Kontrolle	$+_{24}$	$+_{31}$	++	+++!	$\times_{103}$	+++	+++	+++	+++
1/1	„	$+_{19}$	$+_{24}$	++	·	$\dagger_{33}$	+	+	0	+
1/1	„	$+_{19}$	$+_{24}$	++	+++!	$\times_{103}$	+++	+++	++	+++
1/10	vorbeh.: 9×0,2 sc. nachbeh.: 13×0,4 sc. 18×1,5 ip.	$+_{31}$	$+_{24}$	++	+++!	$\times_{106}$	+++	+++	+	++
1/10	vorbeh.: 9×0,2 sc. 13×0,4 sc. 12×1,0 ip.	$+_{24}$	$+_{31}$	+++	+++	$\dagger_{50}$	+	0	0	0
1/10	nachbeh.: 13×0,4 sc. 18×1,5 ip.	0	$+_{24}$	+	+++!	$\times_{89}$	+	0	0	0
1/10	nachbeh.: 13×0,4 sc. 18×1,5 ip.	$+_{31}$	$+_{24}$	++	++	$\times_{81}$	+	0	0	0
1/10	nachbeh.: 13×0,4 sc. 18×1,5 sc.	$+_{24}$	$+_{24}$	++	+++!	$\times_{148}$	+++	+++	0	+++
1/10	nachbeh.: 13×0,4 sc. 18×1,5 sc.	0	$+_{24}$	++	+++!	$\times_{148}$	+++	+++	0	+++
1/10	Kontrolle	0	$+_{31}$	++	++	$\times_{71}$	+++	+	0	+
1/10	„	$+_{31}$	$+_{24}$	++	+++	$\times_{118}$	+++	+++	+	+++
1/10	„	$+_{31}$	$+_{24}$	+	+	$\times_{118}$	+++	+++	+	+++

Bemerkungen: $+_{24}$ bedeutet: Sichtbarwerden nach 24 Tagen.

Größe der Lymphknoten: + = linsengroß
+! = über linsen- bis klein-erbsengroß
++ = erbsengroß
++! = über erbsen- bis klein-bohnengroß
+++ = bohnengroß
+++! = über bohnengroß

ic. = intracutan; sc. = subcutan; ip. = intraperitoneal.

behandelten Tieren wurde der P.A. am 24. Tage manifest. Von 6 nur post inf. in Behandlung genommenen Tieren trat 2mal der P.A. am 24., 1mal am 32. Tag in Erscheinung, während er 2mal auch während längerer Beobachtung ganz ausblieb und 1mal, nämlich bei dem interkurrent gestorbenen M. 1196, nach 30 Tagen noch nicht ausgebildet war. Der Zeitpunkt des Auftretens palpabler Lymphdrüsen (zwischen dem 24. und 31. Tag) bot keine Differenzen zwischen Versuchstieren und Kontrollen. Dasselbe gilt von deren Größe im Lauf der Beobachtung. Bezüglich des Körpergewichts ergab sich in diesem und den folgenden Versuchen nur ein unbeträchtliches Plus zugunsten der behandelten Tiere.

Wenden wir uns nun den Sektionsbefunden zu. Am 30., bzw. 33. Tag post inf. waren 1 Kontrolltier (1228) und 2 behandelte Tiere, davon 1 vor und nach (1182), 1 nur nachbehandelt (1196), interkurrent gestorben. Während das unbehandelte Meerschweinchen 1228 in Lunge und Milz linsengroße tuberkulöse Herde aufwies, waren die behandelten davon frei. Die cubitalen Lymphdrüsen waren bei allen linsengroß. Ein am 50. Tag spontan gestorbenes, nur nachbehandeltes Tier (1198) wies denselben Befund einer äußerst geringfügigen Infektion auf. Am 75. und 87. Tag wurden 3 Tiere (1197, 1181 und 1199) getötet und seziert, um den weiteren Verlauf kontrollieren zu können. Auch zu dieser Zeit waren Lunge, Leber und Milz noch frei von tuberkulösen Herden. Der Befund deckte sich völlig mit dem der früher interkurrent gestorbenen behandelten Tiere. Die noch überlebenden 2 Kontrollen 1226 und 1229 und 3 behandelten Tiere 1183, 1195 und 1214 wurden am 103. Tag post inf. getötet. Die beiden Kontrolltiere hatten, wie zu erwarten war, in den Organen große tuberkulöse Herde, die Lymphdrüsen waren vergrößert und derb, zum Teil zentral verkäst. Auch jetzt noch waren Unterschiede zu den 3 behandelten Versuchstieren vorhanden. Leberherde hatte von diesen keines, bei 2 fanden sich in Lunge und Milz spärlich, bei einem reichlicher Tuberkel. Die Lymphknoten wiesen gegenüber den Kontrollen kaum erwähnenswerte Differenzen auf.

Betrachten wir jetzt die Serie, die als Infektionsdosis je $^1/_{10\,000\,000}$ mg Tuberkelbacillen erhielt. Bei den 3 unbehandelten Kontrollen trat in 2 Fällen am 31. Tage der P.A. auf, während er bei 1 Tiere ganz ausblieb. Bei 6 behandelten Tieren trat der P.A. 2mal am 24., 2mal am 31. Tage auf, und 2mal blieb er aus. Die Lymphdrüsen wurden bei allen Tieren zwischen dem 24. und 31. Tag palpabel. Der Befund an den Lymphdrüsen im Verlaufe der Krankheit wies keinerlei nennenswerte Unterschiede auf.

Das am 50. Tage post inf. interkurrent gestorbene Tier Nr. 1237 hatte in Leber, Lunge und Milz keine Tuberkel. Die Portal-, Iliacal-, Tracheal-, Cervical-Lymphknoten waren nur etwa linsengroß. Am 71. Tage post inf. wurde 1 Kontrolltier (1230) getötet. Es wies bei der Sektion miliare Tuberkel in Lunge und Milz und bohnengroße

harte Lymphdrüsen auf, dagegen war die Leber noch frei von tuberkulösen Herden.

Die beiden später, am 81. bzw. 89. Tage getöteten, nur nachbehandelten Versuchstiere (1220 und 1221) zeigten dagegen weder an Lunge noch an Milz verdächtige Knötchen, und die Lymphdrüsen waren nur linsengroß. Im Vergleich zu der noch dazu früher getöteten Kontrolle waren diese beiden behandelten Tiere kaum von der Krankheit befallen.

Am 118. Tage töteten und sezierten wir die beiden noch lebenden Kontrollen 1193 und 1194, die bereits sehr krank erschienen, während die beiden noch lebenden behandelten Meerschweinchen 1222 und 1224 munter waren und erst nach 148 Tagen getötet wurden. Die beiden Kontrollen hatten in Lunge und Milz reichlich, in der Leber spärliche tuberkulöse Herde, die Lymphdrüsen waren bohnengroß. Die behandelten Tiere wiesen den gleichen Befund auf wie die Kontrollen, nur waren bei ihnen in der Leber keinerlei makroskopisch feststellbare tuberkulöse Herde vorhanden.

Das Meerschweinchen 1187, das am 106. Tage post inf. getötet wurde, nimmt eine besondere Stellung ein. Es hatte nämlich die größten Mengen Helpin erhalten. Bei der Sektion bot es ähnlich den später getöteten Kontrollen das Bild einer ungehemmten Entwicklung der Tuberkulose dar. Auf den Zusammenhang der Helpindosierung mit der Entwicklung der Tuberkulose in den inneren Organen kommen wir später bei Besprechung einer Serie von Tieren mit hoher Behandlungsdosis noch zurück.

In der 2. Versuchsreihe, die in Tab. 2 wiedergegeben ist, waren die Behandlungsmengen im ganzen größer als im vorigen Versuch, sonst war die Versuchsanordnung die gleiche.

Wir besprechen zunächst die mit $^1/_{1\,000\,000}$ mg Tuberkelbacillen infizierten Tiere. Der P.A. trat bei den 3 unbehandelten Kontrollen zwischen dem 19. und 43. Tag, bei den 7 behandelten Tieren zwischen dem 23. und 31. Tag auf. Lymphdrüsen wurden bei allen 10 Tieren zwischen dem 21. und 25. Tag palpabel. Ihre Größe im Verlaufe des Versuchs bot keine erwähnenswerten Differenzen dar.

Die beiden Kontrollen 1251 und 1250 starben am 58. bzw. 59. Tag post inf. interkurrent. 1251 hatte erbsengroße harte Lymphdrüsen und linsengroße tuberkulöse Milzherde, 1250 mäßig reichliche Tuberkel in Lunge und Milz und bohnengroße Lymphdrüsen. Sämtliche übrigen Tiere wurden zwischen 69 und 74 Tagen post inf. getötet.

Die Kontrolle 1312 hatte ziemlich reichliche Tuberkel in der Lunge, einzelne in der Milz und bohnengroße Drüsenpakete. Von dieser Kontrolle waren die beiden behandelten Tiere 1343 und 1344 nicht unterschieden, 1343 sogar eher etwas schlechter. Was die 3 vor- und nachbehandelten

Tabelle 2. *Vor- und Nachbehandlung mit kleinen und mittleren Dosen Helpin.*

Meerschw. Nr.	Infektion Millionstel mg	Behandlung mit Helpin in ccm	Primäraffekt	Lymphdrüsen	Größe der reg. Lymphdrüsen nach 30 Tagen	Größe der reg. Lymphdrüsen nach 60 Tagen	† oder × nach Tag.	Grad der Tuberkulose beim Sektionsbefund der Lymphknoten	Milz	Leber	Lunge
1343	$^1/_1$	vorbeh.: 14×0,4 ic. nachbeh.: 24×1,0 ip. 8×3,0 ip.	$+_{23}$	$+_{23}$	+++!	+++!	$×_{69}$	+++	++	0	++
1344	$^1/_1$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 28×1,0 ip. 8×3,0 ip.	$+_{23}$	$+_{25}$	+++	+++!	$×_{69}$	+++	+	0	− −
1346	$^1/_1$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 28×1,0 ip. 8×3,0 ip.	$+_{23}$	$+_{23}$	+++	+++	$×_{71}$	++	+	0	0
1347	$^1/_1$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 28×1,0 ip. 8×3,0 ip.	$+_{23}$	$+_{23}$	+++	+++!	$×_{71}$	++	+	0	0
1348	$^1/_1$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 28×1,0 sc. 8×3,0 ip.	$+_{23}$	$+_{23}$	+++	+++	$×_{71}$	+++	+	0	+
1358	$^1/_1$	nachbeh.: 35×1,0 ip. 8×2,5 ip.	$+_{31}$	$+_{25}$	+!	+++	$×_{74}$	+	0	0	+
1359	$^1/_1$	nachbeh.: 35×1,0 ip. 8×2,5 ip.	$+_{25}$	$+_{25}$	++	+++!	$×_{74}$	+++	++	0	0
1250	$^1/_1$	Kontrolle	$+_{43}$	$+_{21}$	++	+++!	$†_{59}$	+++	++	0	++
1251	$^1/_1$	„	$+_{25}$	$+_{25}$	+++	+++!	$†_{58}$	++	+	0	0
1312	$^1/_1$	„	$+_{19}$	$+_{22}$	+++!	+++!	$×_{71}$	+++	+	0	++
1351	$^1/_{10}$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 35×1,0 ip. 8×2,5 ip.	0	0	0	++	$×_{64}$	++	+	0	0
1352	$^1/_{10}$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 35×1,0 ip.	$+_{36}$	$+_{31}$	+!	+++	$†_{47}$	+	0	0	0
1353	$^1/_{10}$	vorbeh.: 14×0,4 sc. nachbeh.: 21×1,0 ip.	0	$+_{23}$	+++	++	$†_{44}$	+	0	0	0
1360	$^1/_{10}$	nachbeh.: 35×1,0 ip. 8×2,0 ip.	0	$+_{36}$	0	+++	$×_{65}$	+	0	0	0
1253	$^1/_{10}$	Kontrolle	0	$+_{22}$	+++	+++	$×_{65}$	++	0	0	0
1254	$^1/_{10}$	„	$+_{18}$	$+_{21}$	+++!	+++!	$×_{65}$	+++	++	0	+
1355	$^1/_{10}$	„	$+_{22}$	$+_{22}$	++	+++!	$×_{66}$	+++	+++	0	− − −
1356	$^1/_{10}$	„	$+_{22}$	$+_{22}$	++!	+++!	$×_{68}$	+++	++	0	++

Tiere 1346, 1347 und 1348 betrifft, so waren die Lungen zweier völlig intakt, 1348 hatte einzelne tuberkulöse Herde. In der Milz von allen 3 Tieren fanden sich höchstens hirsekorngroße Knötchen. Die Lymphdrüsen waren etwas geringer affiziert als die der unbehandelten Kontrollen. Die beiden nur nachbehandelten Meerschweinchen 1358 und 1359 zeigten eine nur um ein weniges geringere Tuberkulose als die Kontrolle 1312. Günstiger war der Befund bei den mit $^1/_{10\,000\,000}$ mg infizierten

Tieren. Von 4 Kontrolltieren blieb nur 1 ohne P.A. (1253), bei den anderen 3 Tieren trat er zwischen dem 18. und 22. Tag auf. Von den 4 behandelten Tieren entwickelte sich dagegen nur bei einem (1352), und bei diesem verspätet, am 36. Tage ein P.A.; die 3 anderen blieben dauernd frei; Lymphdrüsen wurden bei den Kontrollen zwischen 21. und 22. Tag post inf. palpabel, bei den behandelten zwischen 23. und 36. Tag; 1 Tier blieb ohne tastbare Lymphdrüsen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, entwickelte sich die Lymphdrüsenerkrankung der behandelten Tiere etwas langsamer als die der Kontrollen. Bei der Sektion der am 44. und 47. Tage post inf. spontan gestorbenen behandelten Tiere 1353 und 1352 waren die Drüsen nur schwach affiziert, Lunge und Milz waren makroskopisch völlig frei von Tuberkulose. Die 4 Kontrollen wurden zwischen dem 65. und 68. Tag getötet und untersucht. Von diesen hatte 1253, das auch ohne P.A. geblieben war, keine Herde in Lunge und Milz und nur erbsengroße innere Lymphdrüsen. Die 3 anderen Kontrollen wiesen in Lunge und Milz ziemlich zahlreiche Tuberkel auf, die Drüsen waren gleichmäßig stark befallen. Das am 65. Tage getötete Versuchstier 1360, das nur nachbehandelt war, war in Lunge und Milz frei von tuberkulösen Herden geblieben, die Drüsen waren nicht über linsengroß. Nr. 1351, das am meisten Helpin bekommen hatte, zeigte am 64. Tage post inf. etwa hirsekorngroße Herde in der Milz, die Drüsen waren erbsengroß, die Lunge jedoch war noch frei von Tuberkeln. Intra vitam hatte es weder einen Primäraffekt noch palpable Lymphdrüsen gezeigt.

Ein 3. Versuch an 14 Tieren mit derselben Versuchsanordnung unterschied sich dadurch von den beiden anderen, daß die Behandlungsdosen 3—5fach höher gewählt wurden. Es wurden pro dosi bis zu 5 ccm intraperitoneal injiziert und diese Dosis bis zu 15mal pro Tier verabfolgt.

Eine solche Heraufsetzung der absoluten Menge Helpin bietet augenscheinlich ungünstigere Heilungsbedingungen, denn wir sahen in diesem Versuch zwischen behandelten und unbehandelten Tieren keine bemerkenswerten Unterschiede in der Entwicklung der Tuberkulose. Daß die Wirkung der Lipoide weitgehend von ihrer Dosierung abhängig ist, ist bereits durch die Arbeiten *Kuttners* und *Magats* experimentell nachgewiesen. Das Optimum der zugeführten Helpinmenge für Meerschweinchen bei unserer Fragestellung scheint zwischen 25 und 35 ccm zu liegen, deren Verteilung auf Dosen aus den Tabellen hervorgeht. Es war in dem 3. Versuch aber auch die Infektion etwas stärker (vgl. S. 722).

Zur Verträglichkeit des Helpins ist noch zu bemerken, daß wir Schädigungen nie gesehen haben, daß *bis zu 5 ccm pro dosi injizierten Helpins gut vertragen werden,* und daß die Resorption auch vom Peritoneum so schnell vor sich geht, daß 24 Stunden post injectionem mit bloßem Auge nichts mehr davon nachweisbar ist.

Beurteilung der Ergebnisse.

Überblicken wir die Versuche in ihrer Gesamtheit, so ergibt sich folgendes: Bei keinem der vorbehandelten Meerschweinchen konnte die Infektion ganz verhindert werden. Wenn sehr große Helpinmengen wiederholt verabfolgt wurden, so war, wie der Versuch 3 deutlich erkennen läßt, ein günstiger Einfluß der Behandlung nach keiner Richtung hin nachweisbar. Dagegen sehen wir in den Versuchen der Tab. 1 und 2, wenn auch nicht regelmäßig, so doch bei einem relativ großen Teil der Tiere im Verlauf der Tuberkulose gewisse Unterschiede zugunsten der Helpintiere hervortreten. Die Versuche der Tab. 1 sind günstiger ausgefallen als die der Tab. 2, vielleicht weil auch in den Versuchen der Tab.2 eine größere Helpinmenge verabfolgt wurde. Abgesehen von dem Einflusse der Quantität treten Unterschiede entsprechend den verschiedenen Formen der Behandlung nicht deutlich hervor, im besonderen nicht zwischen den vor- und nachbehandelten und den nur nachbehandelten Tieren.

Ein günstiger Einfluß der Behandlung, um einen solchen handelt es sich augenscheinlich, zeigte sich nun hauptsächlich nach 2 Richtungen: 1. fehlte der Primäraffekt der Haut häufiger bei den behandelten Tieren als bei den Kontrollen. Dies war bei 5 von 15 Meerschweinchen der Tab. 1 der Fall (Kontrollen bei 1 von 6), von den Meerschweinchen der Tab. 2 hatten 3 von 11 keinen Primäraffekt (Kontrollen 1 von 7).

2. sind nach dem *Sektionsbefunde* die behandelten Tiere vielfach weniger tuberkulös als die annähernd zu gleicher Zeit verendeten bzw. getöteten Kontrolltiere. In den Versuchen der Tab. 1 sind von 15 behandelten Tieren 13 besser als die entsprechenden Kontrollen, eins verhält sich wie die Kontrolle, bei einem anderen ist wegen des zu frühen Todes ein Urteil nicht möglich. Bei keinem einzigen der 15 behandelten Meerschweinchen war nach dem Sektionsbefund die Tuberkulose weiter fortgeschritten als bei den Kontrollen. Von 11 behandelten Tieren der Tab. 2 sind 5 besser als die Kontrollen, bei 2 Tieren kann wegen des zu frühen Todes ein sicheres Urteil nicht abgegeben werden, 2 sind den Kontrollen gleich, nur 2 sind vielleicht etwas schlechter als die Kontrolltiere. Recht beachtenswert scheint uns, daß von 6 zwischen 103 und 148 Tagen getöteten *behandelten* Tieren der Tab. 1 keines eine *Lebertuberkulose* aufwies, während dies bei sämtlichen 4 nach derselben Zeit getöteten Kontrollen der Fall war.

Nun ist der Verlauf der Tuberkulose auch bei unseren Kontrollen keineswegs gleichmäßig. Mit Rücksicht hierauf und auf die oben gegebenen Erläuterungen zur Versuchsanordnung ist Vorsicht bei der Beurteilung unserer Ergebnisse geboten. Wir möchten aber doch annehmen, *daß die von uns erhobenen Befunde für eine wenn auch nur geringfügige günstige Wirkung der Helpinbehandlung sprechen.* Um ein

endgültiges Urteil über den Erfolg der Helpinbehandlung bei der experimentellen Tuberkulose abzugeben, dazu ist die Zahl unserer Versuche noch zu gering. Die Versuche werden zur Zeit fortgesetzt.

Schlußsätze.

1. Selbst große Helpinmengen, bis zu 5 ccm, werden bei wiederholter parenteraler Injektion von Meerschweinchen gut vertragen.

2. Durch Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Helpin konnte das Angehen auch einer milden Tuberkuloseinfektion (Impfung intracutan mit kleinsten Bacillenmengen) *in keinem Falle verhindert* werden.

3. Dagegen sprechen die Versuche dafür, *daß durch Vor- und Nachbehandlung mit Helpin sich die Entwicklung der experimentellen Tuberkulose des Meerschweinchens bis zu einem gewissen Grade in günstigem Sinne beeinflussen läßt.*

Literaturverzeichnis.

Kuttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 472. 1907. — *Magat*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **47**, H. 1/2.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie und Hygiene zu Göttingen.
Direktor: Geheimrat *Reichenbach*.)

Über die Abhängigkeit der Hitzeresistenz verschiedener Bakteriensuspensionen von ihrer Dichte.

Von
R. Hückel.

Es ist bekannt, daß für den Ausfall von Desinfektionsversuchen mit Bakterienaufschwemmungen die Dichte der Suspension von Bedeutung ist. *Ficker* hat gezeigt, daß verdünnte Suspensionen von Choleravibrionen durch destilliertes Wasser, Kochsalzlösung oder Hitze schneller abgetötet werden, als dichte. *v. Lingelsheim* und *Eijkmann* kamen bei Versuchen mit Colibakterien zu gleichen Resultaten. Diese Verlängerung der Abtötungszeit dichter Suspensionen bei Einwirkung der verschiedensten Schädlichkeiten (Hitze, Licht, chemische Mittel) kann nach *Reichenbach* als das Resultat zweier verschiedener Einflüsse aufgefaßt werden:

1. als das Resultat des Einflusses der Bakterien*zahl*, denn in einer größeren Keimmenge ist eine größere Anzahl resistenter Keime vorhanden, als in einer kleinen,
2. als das Resultat des Einflusses der Bakterien*dichte*, deren Wesen bislang noch nicht ganz geklärt ist.

Während *Ficker* die höhere Resistenz dichter Suspensionen, welche sich eben zunächst durch eine verlängerte Abtötungszeit kundtut, auf günstigere Wachstumsbedingungen durch mitübertragenes Nährbodenmaterial, das natürlich in einer dichten Aufschwemmung reichlicher vorhanden sein müßte, als in einer dünneren, zurückführt, glaubt *Eijkmann* an eine schützende Wirkung von Stoffen, welche von den sterbenden Keimen abgegeben werden. Auch *Lange* ist der Meinung, daß jene Resistenzsteigerung durch von den Bakterien selbst abgegebene Stoffe bewirkt wird, deren Schutzwirkung aber nur in sehr dichten Suspensionen zum Ausdruck kommt. *Lange* konnte durch Zusatz abgetöteter oder gewaschener und so von etwa anhaftendem Nährbodenmaterial befreiter Keime eine Resistenzsteigerung gegenüber Hitzeeinwirkung erzielen. *Göbel* kam dagegen in seinen Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Dichte einer Bakterienaufschwemmung und ihrer

Hitzeresistenz zu dem Resultat, daß konzentrierte Emulsionen zwar längere Zeit widerstandsfähig seien, als dünnere, stellte aber fest, daß stets in den dünneren viel mehr Keime am Leben blieben, als dem Verhältnis zur konzentrierten Emulsion entsprach. *Göbel* kam also zu dem Ergebnis, daß trotz der längeren Abtötungszeit der konzentrierten Emulsion in Wirklichkeit die Widerstandsfähigkeit des einzelnen Keimes in der konzentrierten Emulsion eine geringere sei, als in der Verdünnung. In Kulturfiltraten konnte er keine schützenden Stoffe nachweisen; es war im Gegenteil in der mit Kulturfiltrat hergestellten Verdünnung überhaupt kein Wachstum zu beobachten, was *Göbel* auf lösliche, *hemmende* Stoffe zurückführte. Den scheinbaren Widerspruch: „größere Widerstandsfähigkeit des einzelnen Keimes in der dünnen Emulsion infolge des Fehlens hemmender Stoffe und längere Resistenzdauer der konzentrierten Emulsion“ erklärte *Göbel* allein aus der größeren absoluten Zahl der Keime in der konzentrierten Emulsion, welche nach der logarithmischen Absterbeordnung eine längere Zeit zur Abtötung nötig haben muß, als eine dünne mit einer kleineren absoluten Keimzahl. *Göbel* lehnt also an Hand seiner Versuchsergebnisse einen resistenzsteigernden Einfluß der Dichte ab.

Anknüpfend an die Göbelschen Versuche stellte sich *Behrens* noch einmal die Frage: spielen außer dem Einflusse der Zahl hinsichtlich der Resistenz der Keime in einer Aufschwemmung noch andere Faktoren eine wichtige Rolle? *Behrens* versuchte auf dreierlei Weise die Frage nach solchen Faktoren zu klären: 1. durch „Zentrifugierversuche“, bei denen die gleiche Zahl zentrifugierter und nicht zentrifugierter Keime in gleicher Dichte der Hitze ausgesetzt wurden; die zentrifugierten Bakterien erwiesen sich in diesen Versuchen widerstandsfähiger, als die nicht zentrifugierten, 2. durch „Waschversuche“, bei denen durch Waschen die gelösten Begleitstoffe verdünnt werden sollten; die gewaschenen Bakterien erwiesen sich resistenter, als die nicht gewaschenen (also an Begleitstoffen reicheren), 3. durch „Verdünnungsversuche“, bei denen die gleiche Menge verschieden konzentrierter Emulsionen der Hitzeeinwirkung ausgesetzt wurden. Der Einfluß der Zahl wurde dann nachträglich ausgeschaltet, indem sämtliche Emulsionen, bevor zur Aussaat geschritten wurde, quantitativ auf den gleichen Verdünnungsgrad gebracht wurden. Hierbei waren die Ergebnisse sehr auffallend; es zeigte sich, daß bei Versuchen mit Pyocyaneus die Widerstandsfähigkeit ein Maximum bei Verdünnungen im Verhältnis 1 : 5 hatte; in stärkeren und geringeren Konzentrationen waren die Keime weniger widerstandsfähig. Bei Coli fand *Behrens* sogar 2 Resistenzmaxima, nämlich in seiner Originalsuspension und in der Verdünnung 1 : 100. *Behrens* kam zu dem Schlusse, daß „die biologischen Faktoren ihren Einfluß keineswegs mit steigender Konzentration im resistenzvergrößernden Sinne bemerkbar

machen“. Er fand im übrigen sogar bei einer dichteren Emulsion fast regelmäßig eine Verminderung der Hitzeresistenz gegenüber einer verdünnteren, was ja im Wesen den Beobachtungen *Göbels* entspricht.

In der vorliegenden Arbeit sollen

1. die Beziehungen zwischen Hitzeresistenz und Suspensionsdichte noch einmal untersuoht und

2. der Frage nach etwaigen Schutzstoffen (*Lange*, *Eijkmann*, u. a.) oder hemmenden Stoffen (*Göbel*) in dichten Suspensionen näher getreten werden.

Um den Einfluß der Bakterien*zahl* von vornherein auszuschalten, wurde die von *Potthoff* im hiesigen Institut ausgearbeitete Versuchsanordnung angewandt, deren Prinzip sich auch *Fleischer* und *Amster* sowie *Behrens* bedienten. Wie schon oben angedeutet, beruht sie auf folgender Überlegung: ist allein die Bakterien*zahl* für die größere Resistenz dichter Aufschwemmungen verantwortlich, so muß es bei der Aussaat gleicher Bakterienmengen ohne Bedeutung sein, ob man *vor* oder *nach* der Hitzeeinwirkung eine Verdünnung der Aufschwemmung vornimmt; übt dagegen die Bakterien*dichte* irgendeinen Einfluß auf die Resistenz aus, so muß die *nach* der Hitzeeinwirkung hergestellte Verdünnung eine andere Anzahl lebender Keime enthalten, als dieselbe Verdünnung, welche *vor* der Hitzeeinwirkung hergestellt wurde. Ist die Wirkung der Dichte eine Schutzwirkung, so müssen in der *nach* der Hitzeeinwirkung hergestellten Verdünnung *mehr* lebende Keime vorhanden sein, als in derselben Verdünnung, die *vor* der Hitzeeinwirkung vorgenommen wurde. Der Vorzug dieser Versuchsanordnung ist, daß man *gleiche* Bakterienmengen aus *verschieden dichten* Aufschwemmungen *nach* der Hitzeeinwirkung auf ihren Gehalt an lebenden Keimen vergleichend betrachten kann.

Eine Klärung der Frage, ob von den Bakterien Stoffe irgendwelcher Art an das Suspensionsmittel abgegeben werden, wurde auf folgende Weise erstrebt: Dichte Suspensionen wurden ohne oder nach Hitzeeinwirkung durch Membranfilter filtriert und die Einwirkung des auf diese Weise bakterienfrei gemachten Suspensionsmittels auf die Resistenz von dünnen Suspensionen der gleichen und einer anderen Bakterienart untersucht, indem das Filtrat erneut als Suspensionsmittel verwandt wurde.

Methodik.

Die Versuche wurden mit Aufschwemmungen von Bacterium coli, Staphylokokken und Bacillus pyocyaneus, die aus alten Institutsstämmen hergestellt wurden, folgendermaßen vorgenommen: von einer 24 Stunden alten Agarplattenkultur wurden mit der Öse unter peinlicher Vermeidung einer Verletzung des Nährbodens die oberen Partien der Kolonien abgenommen, an der Innenwand eines mit destilliertem Wasser nur wenig gefüllten Röhrchens vorsichtig fein verrieben und von dort mit dem im Röhrchen befindlichen Wasser abgeschwemmt.

Es wurde also die Mitübertragung von Nährbodenmaterial nach Möglichkeit vermieden. Die Dichte dieser „Originalsuspensionen" fiel naturgemäß etwas verschieden aus, war aber stets so, daß eine starke milchige Trübung zu sehen war. Im Kubikzentimeter waren, wenn es sich um Coli handelte, 1—2 Milliarden Keime, bei Staphylokokken gewöhnlich etwas weniger vorhanden. Die Verdünnungen, welche von dieser Originalsuspension hergestellt wurden, waren 1 : 100, 1 : 10 000, 1 : 1 000 000; sie wurden folgendermaßen gewonnen: für jede Verdünnung wurde je ein Erlenmeyer-Kölbchen mit 19,8 ccm destillierten, durch Kochen kohlensäurefrei gemachten Wassers beschickt; aus der Originalaufschwemmung wurde nun in das erste mittels Pipette 0,2 ccm hineingebracht, so daß in diesem nunmehr 20 ccm einer Verdünnung 1 : 100 waren (hier war stets noch eine schwache, aber deutliche Trübung zu sehen); von dieser Verdünnung wurden nach fleißigem Durchmischen wiederum 0,2 ccm in das nächste Kölbchen gebracht, welches nunmehr 20 ccm einer Verdünnung 1 : 10 000 enthielt. In entsprechender Weise wurde die letzte Verdünnung 1 : 1 000 000 gewonnen. Originalaufschwemmung und die Verdünnungen wurden in dickwandigen, ca. 10 cm langen Röhrchen in einem Wasserbad der Hitzeeinwirkung ausgesetzt. Das Wasserbad, welches in der größeren Zahl der Versuche mit einer elektrisch betriebenen Rührvorrichtung versehen war, wurde bei Versuchen mit Coliaufschwemmungen auf einer konstanten Temperatur von 50,0° oder 50,5°, bei Staphylokokkenversuchen auf 50,0° oder 49,5° gehalten. Es hatte sich in Vorversuchen herausgestellt, daß Staphylokokkenemulsionen von der Dichte etwa einer Milliarden Keime im Kubikzentimeter bei 50,5° in 15 Min. vollständig abstarben, während dies bei Colibakterien nicht der Fall war. Die schon im Wasserbad befindlichen warmen Röhrchen wurden mit den verschieden dichten Emulsionen nacheinander beschickt; die Entnahme erfolgte dann in der gleichen Zeitfolge wie die Beschickung (Stoppuhr), so daß bei jeder Entnahme die betreffende Aufschwemmung dieselbe Zeit der Hitzeeinwirkung ausgesetzt war wie die vorherige. Entnommen wurde aus jedem Röhrchen nach 15, 30, 50, 80 und 120 Min.; bei einigen Versuchen wurde die letzte oder die beiden letzten Entnahmen fortgelassen. Die entnommene Menge Suspension (Volumen) betrug stets 0,2 ccm. Diese wurde entweder gleich ausgesät oder nach obigem Prinzip vorher einer erneuten Verdünnung unterzogen, so daß gleiche Bakterienmengen aus verschieden dichten Suspensionen zur gleichen Zeit nach Beginn der Hitzeeinwirkung direkt miteinander verglichen werden konnten. Auf diese Weise wurde also die Wirkung der Zahl ausgeschaltet, so daß *allein* der Einfluß der Dichte auf die Hitzeresistenz in den verschiedenen Suspensionen studiert werden konnte. Die 0,2 ccm Aussaat wurden dann in eine bereitgestellte sterile Schale gebracht, welche dann mit Gelatine (bei Coli), mit Agar (meist bei Staphylokokken und bei Pyocyaneus) ausgegossen wurde. Vor dem Erstarren wurden die 0,2 ccm Aussaat durch Neigen und Drehen der bedeckten Schale mit dem Nährboden gut gemischt und auf eine Nivelliereinrichtung gebracht, welche eine gleichmäßige Dicke der Nährbodenschicht in der Schale gewährleistete. Bei Gelatineplatten wurde die Glasplatte der Nivelliereinrichtung von unten mit Eis gekühlt, um das Erstarren zu beschleunigen. Eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Keime in dem noch flüssigen Nährboden mußte angestrebt werden, um die spätere Zählung zu erleichtern und möglichst genau zu gestalten. Die *Technik der Zählung* würde folgendermaßen gehandhabt: Waren nur wenige hundert Keime oder eine geringere Menge auf der Platte gewachsen, so war die Zählung mit dem unbewaffneten Auge oder mit der Lupe bei untergelegtem Zählnetz sicher und gut, was vergleichende Zählungen gleich großer ausgesäter Keimmengen in Vorversuchen zeigten. Es wurde hierbei stets die ganze Platte ausgezählt, wodurch der Fehler einer etwaigen ungleichmäßigen

Verteilung der Kolonien auf der Platte ausgeschaltet wurde. Für die Auszählung dichter bewachsener Platten wurde folgendes Verfahren eingeschlagen: Die Größe der Gesichtsfelder dreier Objektive wurde mittels eines Objektträgermikrometers bestimmt und der zugehörige Tubusauszug festgelegt. Wurden nun die Kolonien einer größeren Anzahl Gesichtsfelder ausgezählt, so ließ sich bei Kenntnis der absoluten Fläche der ganzen Platte die Anzahl der auf ihr vorhandenen Kolonien leicht berechnen; durchgezählt wurden meist 40 Gesichtsfelder aus den verschiedensten Gegenden der Platte; je nach der Dichte der Verteilung der Kolonien wurden die verschieden starken Objektive benutzt. Die Genauigkeit der auf diese Weise vorgenommenen Zählung war eine recht zufriedenstellende, was aus den unten folgenden Tabellen ersichtlich ist: Der Keimgehalt der 100fachen Verdünnung einer Suspension war gewöhnlich von dem errechneten 100. Teil nur um wenige Prozent verschieden.

Es zeigte sich, daß die Fehlergrenzen der Methodik bei den festgestellten großen Unterschieden im Gehalt lebender Keime, wie sie die Versuche bei gleicher Aussaatmenge ergaben, überhaupt nicht ins Gewicht fallen. Die Aussaat von 0,2 ccm der Originalsuspension und der Verdünnung 1 : 100 erwies sich als zu dicht für eine exakte Zählung; diese wurde daher fast stets auf die Verdünnungen 1 : 10 000 und 1 : 1 000 000 beschränkt. Bei sehr dünnen Suspensionen zeigte sich im Verlauf der Versuche eine Fehlerquelle, die aber später ausgeschaltet werden konnte. Während eines 2stündigen Versuches pflegen nämlich in die im Wasserbad offen hängenden Röhrchen Luftkokken hinzufallen, die mit ausgesät werden und deren Kolonien, wenn es sich auf der Platte nur um einige wenige Versuchskolonien handelt, nicht mitgezählt werden dürfen. Dies geschah aber anfangs in einigen Versuchen versehentlich, da sich die Kolonien der Luftkokken zur Zeit der Zählung von denen der Versuchsbakterien noch nicht unterschieden. Erst, als die Kolonien älter wurden, stellte sich einwandfrei heraus, daß es sich um weiß wachsende Luftkokken handelte.

Die *Filtration* von Suspensionen zwecks Trennung der Bakterien von den etwa von ihnen in das Suspensionsmittel abgegebenen Stoffen geschah mittels Membranfilter nach *Zsigmondy-Bachmann*; bei einer Porenweite von 0,75 μ wurden stets sterile Filtrate gewonnen: 1 ccm des Filtrats wurde bei jedem Versuch in Gelatine ausgegossen und erwies sich ausnahmslos als steril.

Ergebnisse.

1. Der Einfluß der Dichte auf die Hitzeresistenz.

Ausgesät wurde stets die gleiche Volumenmenge von 0,2 ccm Suspension. Aus den dichten Suspensionen wurde die in 0,2 ccm enthaltene Bakterienmenge durch eine Verdünnungsreihe, wie sie in der Methodik geschildert wurde, nach der Hitzeeinwirkung auf die in 0,2 ccm der vor der Hitzeeinwirkung verdünnten Emulsionen vorhandenen Bakterienmenge reduziert. Die Zahlen in den Tabellen geben an, wieviel Keime von der Ausgangszahl der in der dünnsten Suspension vor der Hitzeeinwirkung in 0,2 ccm vorhandenen Bakterien in den verschiedenen dichten Suspensionen zu den verschiedenen Entnahmezeiten überlebten. In bezug auf die Zeit gerechnet vom Beginn der Hitzeeinwirkung an, sind die Ergebnisse der Entnahmen derselben Verdünnung im Druck *untereinander* aufgeführt, so daß man, wenn man die Zahlen eines Stabes von oben nach unten verfolgt, das Bild des abnehmenden Gehaltes an

lebenden Keimen einer bestimmten Verdünnung erhält. Liest man von links nach rechts, so vergleicht man die Zahlen der überlebenden Keime *derselben* Bakterienmenge aus den *verschieden dichten* Suspensionen. Die Ausgangszahl, deren verschieden schnelles Absterben in den verschieden dichten Anschwemmungen die Tabellen vor Augen führen, findet sich stets bei der Zeit „0" angegeben, d. h. vor Beginn der Hitzeeinwirkung.

Bei Tab. 1—6 handelt es sich um Colisuspensionen, die einer Hitze von 50,5° ausgesetzt wurden. Bei Tab. 1—3 (3 verschiedene Versuche) zeigt Stab 1 die Abnahme des Keimgehaltes der Verdünnung 1 : 10^6,

Tabelle 1.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3	4
	Verdünnung 1 : 10^6	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^4	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^2	Verdünnung 1 : 10^6 aus Original
0	218			
15	88	98	156	252
30	20	26	118	242
50	—[1]	3	46	240
80	2	3	28	133
120	2	2	13	92

Tabelle 2.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3	4
	Verdünnung 1 : 10^6	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^4	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^2	Verdünnung 1 : 10^6 aus Original
0	296			
15	64	102	175	284
30	13	49	141	224
50	1	16	52	188
80	1	2	35	170
120	0	0	4	135

Tabelle 3.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3	4
	Verdünnung 1 : 10^6	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^4	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^2	Verdünnung 1 : 10^6 aus Original
0	336			
15	180	223	—[2]	254
30	94	86	—	157
50	19	34	—	119
80	0	1	—	46

[1]) Platte verdorben.
[2]) Spontanagglutination.

Stab 2 die Abnahme derselben Bakterienmenge aus der Verdünnung 1 : 10^4, Stab 3 die der gleichen Bakterienmenge aus der Verdünnung 1 : 10^2, und Stab 4 endlich die der gleichen Bakterienmenge aus der Originalaufschwemmung.

Man sieht, daß mit zunehmender Dichte die gleiche Keimmenge immer mehr lebende Individuen enthält, als die vorhergehende Verdünnung. Der Unterschied ist um so deutlicher ausgeprägt, je länger der Versuch dauert, je länger also die verschieden dichten Suspensionen der Hitzeeinwirkung ausgesetzt bleiben. Etwaige Zufälligkeiten werden ausgeschaltet, wenn wir die 100fache Keimmenge zur Zählung benutzen. Hierbei lassen sich dieselben Verhältnisse demonstrieren: Tab. 4—6, die aus den gleichen 3 Versuchen gewonnen wurden, wie Tab. 1—3, zeigen die Zahlen:

Tabelle 4.

Zeit v. Beginn d. Hitzeeinwirk. an (Min.)	1	2	3
	Verdünn. 1 : 10^4	Verdünn. 1 : 10^4 aus 1 : 10^2	Verdünn. 1 : 10^4 aus Original
0	23 558		
15	10 795	14 921	24 003
30	2 902	10 949	23 813
50	228	4 763	23 866
80	19	3 307	12 938
120	5	1 447	9 345

Tabelle 5.

Zeit v. Beginn d. Hitzeeinwirk. an (Min.)	1	2	3
	Verdünn. 1 : 10^4	Verdünn. 1 : 10^4 aus 1 : 10^2	Verdünn. 1 : 10^4 aus Original
0	30 480		
15	10 406	13 972	29 908
30	4 318	12 073	26 974
50	1 588	5 750	17 780
80	196	3 460	13 478
120	9	432	11 520

Tabelle 6.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3
	Verdünnung 1 : 10^4	Verdünnung 1 : 10^4 aus 1 : 10^2	Verdünnung 1 : 10^4 aus : Orig.
0	33 437	—[1])	
15	15 812	—	24 448
30	11 239	—	13 462
50	4 191	—	8 157
80	72	—	4 382

Die gleiche Anfangsmenge von ca. 30 000 Bakterien (Tab. 5) enthält also nach 2 Stunden Hitzeeinwirkung in der 100fachen Dichte ein Mehr an lebenden Keimen, welches sich durch Multiplikation mit einem Faktor der Größenanordnung 50, in der 10 000fachen Dichte ein Mehr, welches sich durch Multiplikation mit einem Faktor der Größenordnung 1000 aus der Zahl der in der Bezugsverdünnung überlebenden Individuen ergibt. *Der einzelne Keim ist also in einer dichteren Aufschwemmung ganz erheblich resistenter als in einer dünneren.*

[1]) Spontanagglutination.

Waren vorstehende Tabellen aus Versuchen mit Bakterium coli gewonnen, so lassen sich in den folgenden Tabellen, denen Versuche mit gelb wachsenden Staphylokokken zugrunde liegen, die gleichen Verhältnisse darlegen. Die Emulsionen wurden hier etwas dünner gewählt als in den vorhergehenden Versuchen. Es seien zunächst Versuche angeführt, bei denen die Staphylokokken in Gelatine wachsen gelassen wurden[1]). Die Technik war die gleiche wie bei den Versuchen mit Coli. Tab. 7 zeigt von links nach rechts wiederum die Anzahl der überlebenden Individuen derselben Bakterienmenge aus verschieden dichten Suspensionen.

Tabelle 7.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3	4
	Verdünnung 1 : 10^6	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^4	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^2	Verdünnung 1 : 10^6 aus Original
0	119			
15	1	4	10	32
30	0	1	2	8
50	0	0	2	4

Auch bei diesen relativ dünnen Aufschwemmungen ist also ebenfalls die größere Resistenz der Keime in den dichteren Suspensionen deutlich ausgeprägt.

Folgende Versuche (Tab. 8 und 9), bei denen die Staphylokokken in Agar auswachsen gelassen wurden, hatten dasselbe Ergebnis.

Tabelle 8.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3	4
	Verdünnung 1 : 10^6	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^4	Verdünnung 1 : 10^6 aus 1 : 10^2	Verdünnung 1 : 10^6 aus Original
0	29			
15	1	1	2	14
30	2	2	3	5
50	1	2	1	3

(Die letzten Entnahmen stehen etwas unter dem Einfluß zur Zeit der Zählung noch unerkannter Luftkokkenkolonien, vgl. o. unter „Methodik“.)

[1]) Man kann auch Gelatine verflüssigende Staphylokokken zur Auszählung in Gelatine wachsen lassen; nur muß man zur Zählung den richtigen Zeitpunkt erfassen, in dem die Kolonien schon deutlich sichtbar sind, aber den Nährboden noch nicht verflüssigt haben. Agar eignet sich aber vor allem als Nährboden für Staphylokokken besser als Gelatine.

Tab. 9 zeigt dieselben Verhältnisse für die hundertfache Bakterienmenge.

Tabelle 9.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3
	Verdünnung 1 : 10⁴	Verdünnung 1 : 10⁴ aus 1 : 10²	Verdünnung 1 : 10⁴ aus Orig.
0	2782		
15	40	204	1192
30	1	4	123
50	0	2	16

Aus den Versuchen, die den Tab. 1—9 zugrunde liegen, geht eindeutig hervor, daß sich während einer Versuchsdauer bis zu teilweise 2 Stunden bei 3 bis 5maliger Entnahme *der einzelne Keim in den dichteren Aufschwemmungen resistenter erwies als in den dünneren, und zwar um so resistenter, je dichter die Aufschwemmung war.*

Um zu entscheiden, ob die Ergebnisse *Göbels* (s. o) den vorliegenden deshalb widersprechen, weil er mit Bac. Pyocyaneus arbeitete und andere Verdünnungsflüssigkeiten, nämlich Bouillon und Kochsalzlösung verwandte, während vorstehende Versuche stets mit kohlesäurefreiem destilliertem Wasser angestellt wurden, wurde ein besonderer Versuch gemacht, in dem verschieden dichte Pyocyaneusaufschwemmungen in Bouillon, wie sie auch *Göbel* verwandte, in bezug auf ihre Hitzeresistenz (Temp. 50,0°) geprüft wurden. Die Methodik war die gleiche, wie bei den obigen Versuchen. Um etwaige Einflüsse einer Änderung des Mediums auf die Keime auszuschalten, wurden diese auch in den Verdünnungsreihen *nach* der Hitzeeinwirkung nur durch Bouillon hindurchgeführt. Ergebnisse:

Tabelle 10.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2
	Verdünnung 1 : 10³	Verdünnung 1 : 10² aus Original
0	—[1])	
15	—[1])	
30	—[1])	—[1])
50	51 057	—
80	10 460	40 950

Tabelle 11.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3
	Verdünnung 1 : 10⁴	Verdünnung 1 : 10⁴ aus 1 : 10²	Verdünnung 1 : 10⁴ aus Original
0	16 002		
15	4 599	6930	10 080
30	1 890	2929	7 182
50	71	480	882
80	4	106	384

Wie Tab. 10—12 zeigen, erweisen sich auch die einzelnen Keime der Pyocyaneussuspensionen in Bouillon in größerer Dichte gegen Hitze resistenter als in geringerer. *Göbels* Ergebnisse konnten also nicht

[1]) Zum Zählen waren die Platten zu dicht bewachsen.

Tabelle 12.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	3	4
	Verdünnung $1:10^6$	Verdünnung $1:10^6$ aus $1:10^4$	Verdünnung $1:10^6$ aus $1:10^2$	Verdünnung $1:10^6$ aus Original
0	164			
15	18	50	60	96
30	3	21	28	72
50	0	0	3	12
80	0	0	1	4

bestätigt werden. Auch die Versuchsergebnisse *Behrens*, welcher fand, daß „die biologischen Faktoren ihren Einfluß keineswegs mit steigender Konzentration im restistenzvergrößernden Sinne bemerkbar machen", finden durch die vorliegenden Versuche keine Stütze. Es erwies sich vielmehr bei den Pyocyaneusaufschwemmungen in Bouillon ganz ebenso wie bei den vorher angeführten Suspensionen die Tatsache, daß *bei allen 4 verschiedenen Suspensionsdichten sämtlicher Versuche zu allen Entnahmezeiten eine zahlenmäßig genau bestimmte Keimmenge aus der jeweils dichteren Suspension ausnahmslos resistenter war, als die gleiche Keimmenge aus sämtlichen verdünnteren.*

2. Untersuchungen über die Schutzwirkung in dichten Suspensionen.

Zuerst war die Frage zu klären, ob die Schutzwirkung in dichten Suspensionen gegen den schädigenden Einfluß der Hitze ein von den Bakterien trennbares Prinzip darstelle, ob es sich also um „Schutzstoffe" handele, die von den Bakterien an das Suspensionsmittel abgegeben werden und deren Existenz schon *Eijkmann* und *Lange* angenommen haben. Zu diesem Zwecke wurde zunächst eine dichte Colisuspension, 80 Min. lang im Wasserbad einer Hitze von 50,0° ausgesetzt, herausgenommen, auf Zimmertemperatur abgekühlt und durch ein Membranfilter nach *Zsigmondy-Bachmann* von der Porenweite 0,75 μ unter sterilen Kautelen filtriert. Es ergab sich ein vollständig klares, steriles Filtrat. Nunmehr wurde eine neue Coliaufschwemmung hergestellt, welche in 2 gleiche Verdünnungsreihen gebracht wurde, und zwar $1:10^2$, $1:10^4$, $1:10^6$. Als Verdünnungsflüssigkeit diente in der 1. Reihe wie in allen vorherigen Versuchen destilliertes kohlensäurefreies Wasser, in der 2. Reihe das Filtrat. Der Hitze ausgesetzt wurden nur die Verdünnungen $1:10^4$ und $1:10^6$. Beide Verdünnungsreihen, in denen also je 2 sich entsprechende Röhrchen in gleichen Volumen dieselbe Bakterienmenge enthielten, wurden nunmehr gleichzeitig in demselben Wasserbad unter ganz gleichen Bedingungen einer Temperatur von 50,5° ausgesetzt und ihre Resistenz geprüft. Das Ergebnis zeigt Tab. 13.

Tabelle 13.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1 Verdünnung 1 : 10⁴ destill. Wasser	2 Verdünnung 1 : 10⁴ Filtrat	3 Verdünnung 1 : 10⁶ destill. Wasser	4 Verdünnung 1 : 10⁶ Filtrat
0	40 870	39 924	390	392
15	20 130	37 515	344	315
30	—[1])	—[1])	94	296
50	6 588	34 343	45	232
80	1 569	25 293	8	167
120	576	23 607	2	132

Diese Zahlen lehren, daß *die Schutzwirkung einer dichten Suspension von den Bakterien trennbar und auf eine neue, stark verdünnte übertragbar ist.* Die anfängliche Bakterienmenge von ca. 40 000 in 0,2 ccm destilliertem Wasser wurde unter dem schädigenden Einfluß der Hitze innerhalb von 2 Stunden auf den 70. Teil reduziert (Tab. 13, Stab 1), in dem anderen Röhrchen aber, wo sie durch das Filtrat geschützt war, in derselben Zeit noch nicht einmal auf die Hälfte (Tab. 13, Stab 2). Die prinzipiell gleichen Verhältnisse lassen sich ebenso einleuchtend an der 100fachen Verdünnung jener Bakterienmenge, nämlich bei dem Anfangsgehalt von 390 Keimen in 0,2 ccm demonstrieren (Tab. 13, Stab 3 und 4). Es kann sich also wohl nur um Stoffe handeln, die löslich sind und von den Bakterien abgegeben werden. Es war nun weiterhin die Frage zu lösen: werden diese Stoffe von den Bakterien nur in einer Aufschwemmung abgegeben, die der Hitze ausgesetzt wird oder gelangen sie auch ohne Hitzeeinwirkung bei Zimmertemperatur in das Suspensionsmittel? Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Versuch folgender Art angestellt: Eine dichte Colisuspension wurde bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang stehengelassen und dann filtriert; das Filtrat wurde dann als Suspensionsmittel für neue dünnere Aufschwemmungen verwertet, deren Hitzeresistenz untersucht wurde. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Tab. 14.

Tabelle 14.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung ab Minuten	1 Verdünnung 1 : 10⁴ destill. Wasser	2 Verdünnung 1 : 10⁴ Filtrat	3 Verdünnung 1 : 10⁶ destill. Wasser	4 Verdünnung 1 : 10⁶ Filtrat
0	30 805	32 208	329	324
15	22 448	31 273	186	298
30	9 333	22 526	116	260
50	6 100	—[2])	38	228
80	3 227	15 250	6	165
120	608	11 950	2	142

[1]) Platten verdorben.

[2]) Platte verdorben.

Man sieht hier eine deutliche Schutzwirkung des Filtrats (vgl. Stab 2 mit 1 und Stab 3 mit 4), welche aber vielleicht nicht ganz von der Stärke ist wie im Versuch der Tab. 13. Dort ist in der Verdünnung 1 : 10^4 das Verhältnis der in 0,2 ccm Wasser überlebenden Individuen zu den in 0,2 ccm Filtrat überlebenden 576 : 23 607, hier 608 : 11 950. In den beiden letzten Versuchen (Tab. 13—14) waren die schützenden Filtrate aus dichten Suspensionen gewonnen worden, welche 80 Minuten bzw. 2 Stunden vor der Filtration bereitet waren; um die Frage zu prüfen, ob die fraglichen Stoffe von den Bakterien erst nach einer längeren Zeit oder in wenigen Minuten an das Suspensionsmittel abgegeben werden, wurde in einem Versuche, welcher der Tab. 15 zugrunde liegt, die Filtration 2 Minuten nach Bereitung der Aufschwemmung, welche auch nicht der Hitze ausgesetzt, sondern nur geschüttelt wurde, vorgenommen.

Tabelle 15.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	8	4
	Verdünnung 1 : 10^4 destill. Wasser	Verdünnung 1 : 10^4 Filtrat	Verdünnung 1 : 10^4 destill. Wasser	Verdünnung 1 : 10^4 Filtrat
0	14 400	14 396	169	162
15	10 370	10 126	119	92
30	9 671	8 804	95	91
50	5 952	8 452	56	80
80	3 186	5 636	44	48
120	2 920	3 873	23	31

Man sieht, daß die Schutzwirkung zwar vorhanden, aber außerordentlich viel geringer ist als in den vorherigen Versuchen. Dort betrug bei der Verdünnung 1 : 10^4 nach 2 Stunden Hitzeeinwirkung die Zahl der lebenden Keime der durch Filtrat geschützten Aufschwemmung in 0,2 ccm gegenüber der der ungeschützten Aufschwemmung das 30- bzw. 20fache der letzteren (bei gleicher Ausgangszahl), während sie hier etwa das $1^1/_2$fache beträgt und bei der 100fachen Verdünnung an der Grenze des Nachweises steht. Bei den 1. Entnahmen, bei welchen die vorigen Versuche schon ganz erhebliche Unterschiede erkennen ließen, ist hier überhaupt noch kein Resistenzunterschied zu erkennen. Das Resultat dieses Versuches ist also die Tatsache, daß die Hauptmenge der fraglichen Stoffe erst nach einer längeren Zeit abgegeben wird. Die Abgabe erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach in der Hitze schneller und reichlicher (Tab. 13) als bei Zimmertemperatur (Tab. 14). Zwecks Prüfung der Hitzeresistenz der fraglichen Stoffe wurde das als wirksamstes erkannte durch Hitzeeinwirkung auf eine dichte Colisuspension gewonnene Filtrat erneut bereitet und vor der Prüfung seiner resistenzfördernden Wirkung kurz aufgekocht. Es blieb hierbei vollständig klar.

Nach dem Abkühlen wurde es wie in den vorhergehenden Versuchen geprüft. Das Ergebnis zeigt Tab. 16.

Tabelle 16.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an Minuten	1	2	8	4
	Verdünnung 1 : 10^4 destill. Wasser	Verdünnung 1 : 10^4 gekochtes Filtrat	Verdünnung 1 : 10^6 destill. Wasser	Verdünnung 1 : 10^6 gekochtes Filtrat
0	11 036	11 780	127	131
15	11 000	11 160	100	111
30	6 820	7 564	66	68
50	4 513	6 790	44	65
80	2 480	2 394	18	21

Wenn man auch hier vielleicht eine ganz geringe Resistenzförderung bei der mit Filtrat bereiteten Verdünnung angedeutet findet, so kommt man doch im Vergleich zu Tab. 13 zu dem Ergebnis, daß die außerordentlich starke Schutzwirkung jener Stoffe durch 1 maliges Aufkochen auf ein Minimum reduziert, wenn nicht ganz zerstört wird. Der Versuch lehrt aber auch, daß es sich wohl nicht um Nährbodenstoffe handeln kann, welche kaum durch 1maliges Aufkochen in ihrer Wirksamkeit derart geschwächt würden. (Gegen einen resistenzfördernden Einfluß von etwa mitübertragenem Nährbodenmaterial sprechen auch die Versuche, die den Tab. 10—12 zugrunde liegen, denn hier trat auch die geringere Widerstandsfähigkeit dünner Suspensionen deutlich hervor, obgleich ihnen ebenso wie den dichten das gleiche Nährmaterial zur Verfügung stand, da die Aufschwemmungen in Bouillon bereitet waren, wobei die bei den dichten Suspensionen etwa vorhandene größere Menge mitübertragenen Nährbodenmaterials sicherlich keine Rolle spielen würde.)

Um in die Natur jener Stoffe weiter einzudringen, wurde die Frage nach etwaiger Spezifität aufgeworfen; diese wäre erwiesen, wenn es gelänge, mit dem Filtrat einer Aufschwemmung einer bestimmten Bakterienart *nur* verdünnte Suspensionen *derselben* Art zu schützen, während jener Schutz dünnen Suspensionen einer *anderen* Bakterienart gegenüber versagen müßte. Zur Klärung dieser Frage wurden wieder Coli- und Staphylokokkensuspensionen herangezogen. Daß Colifiltrat Colisuspension schützt, war schon in mehreren Versuchen bewiesen worden; es mußte zunächst noch gezeigt werden, daß Staphylokokkenfiltrat Staphylokokkenemulsion schützt, was ja von vornherein wahrscheinlich war; dann erst konnte die Probe gemacht werden, ob die Schutzwirkung des Staphylokokkenfiltrats einer dünnen Coliaufschwemmung gegenüber versagt, und ob umgekehrt die schützende Wirkung des Colifiltrats sich *nur* an Colisuspension demonstrieren läßt. Zu diesen

Versuchen wurde wie bisher eine Verdünnungsreihe mit Filtrat und zur Kontrolle der Schutzwirkung eine mit destilliertem Wasser angelegt.

Die folgenden Tab. 17—19 geben die Resultate dieser Versuche wieder.

Tabelle 17. *Staphylokokkenfiltrat*; *Staphylokokkenemulsion*.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an in Min.	Verdünnung $1:10^4$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^4$ Staph.-Filtrat	Verdünnung $1:10^6$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^6$ Staph.-Filtrat
0	12 800	12 000	134	136
15	1 888	10 912	16	68
30	45	1 024	2	9
50	0	12	0	1
80	0	0	0	0
120	0	0	0	0

Das Filtrat, welches von einer dichten Staphylokokkenaufschwemmung, die 1 Stunde lang einer Temperatur von 49,5° ausgesetzt worden war, erwies sich also einer relativ dünnen Staphylokokkenemulsion gegenüber — ganz analog den Coliversuchen — als außerordentlich resistenzfördernd, wenn auch in beiden Verdünnungsreihen ein ziemlich schnelles Absterben erfolgte.

Tabelle 18. *Staphylokokkenfiltrat*; *Coliemulsion*.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an in Min.	Verdünnung $1:10^4$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^4$ Staph.-Filtrat	Verdünnung $1:10^6$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^6$ Staph.-Filtrat
0	26 994	26 686	256	264
15	18 808	19 904	160	164
30	9 330	14 368	29	66
50	704	7 650	4	36
80	14	3 200	1	17
120	0	1 458	0	6

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß Colibakterien auch mit Staphylokokkenfiltrat geschützt werden können, daß also das Staphylokokkenfiltrat nicht allein spezifisch auf Staphylokokken schützend wirkt.

Tabelle 19. *Colifiltrat*; *Staphylokokkenemulsion*.

Zeit vom Beginn der Hitzeeinwirkung an in Min.	Verdünnung $1:10^4$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^4$ Colifiltrat	Verdünnung $1:10^6$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^6$ Colifiltrat
0	12 870	12 610	129	148
15	5 386	9 555	46	94
30	262	5 752	3	41
50	7	608	0	6
80	3	6	0	4
120	0	4	0	0

Diese Zahlen zeigen, daß auch das Colifiltrat unspezifisch wirkt.

Die beiden letzten Versuche lehren also, daß die filtrierbaren, aus dichten Suspensionen gewonnenen, die Hitzeresistenz steigernden Stoffe für die untersuchten Bakterien *nicht* spezifisch sind, sondern eine kreuzweise Wirkung ausüben können. *Lange* konnte eine auffallende Steigerung der Widerstandsfähigkeit der resistenteren Colikeime gegen Hitze durch Zugabe von schwächer resistenten Staphylokokken in dichten Suspensionen konstatieren. Er erblickte in dieser Tatsache einen Beweis dafür, daß die Widerstandsfähigkeit von Bakterien durch *unspezifische* Bakterienstoffwechselprodukte bzw. Bestandteile von Bakterienleibern unter gewissen Bedingungen erheblich gesteigert werden kann. Auch obige Versuche sprechen für die Existenz solcher *unspezifischer, Membranfilter passierender, resistenzsteigernder Stoffe.*

Zum Schluß sei noch ein Versuch mitgeteilt, in dem 2 gleiche Verdünnungsreihen hergestellt und hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz geprüft wurden. Als Verdünnungsflüssigkeit der ersten Reihe wurde wie sonst zur Kontrolle destilliertes Wasser verwandt, in der 2. eine sterile Aufschwemmung von Bolus. Diese wurde so bereitet, daß 6 gehäufte Ösen Bolus in 20 ccm Wasser gebracht wurden, wodurch dieses das Aussehen einer sehr dichten Bakterienemulsion erhielt. Es zeigte sich bei diesem Versuch (Tab. 20) keinerlei Schutzwirkung des Bolus, wodurch auch die Frage, ob eine durch anorganische Substanz bedingte „Dichte" eine Schutzwirkung entfalten kann, verneint wird. Der Ausfall dieses Versuches entspricht den Versuchungsergebnissen *Langes*, welcher eine Wirkung auf den Desinfektionsvorgang bei Erhitzung von Suspensionen weder durch Tierkohle, feingestoßenes Jenenser Glas noch durch Baumwollbatist nachweisen konnte, obgleich das Material den Bakteriensuspensionen in sehr großer Menge zugegeben wurde.

Tabelle 20.

Zeit und Beginn der Hitzeeinwirkung an in Min.	Verdünnung $1:10^4$ destill. Wasser	Verdünnung $1:10^4$ Bolus	**Verdünnung $1:10^6$ destill. Wasser**	**Verdünnung $1:10^6$ Bolus**
0	ca. 50 000	ca. 50 000	**504**	**592**
15	37 600	35 990	**272**	**296**
30	16 531	18 027	**188**	**192**
50	14 884	14 823	**144**	**164**
80	8 784	7 503	**52**	**56**
120	6 954	6 100	**32**	**32**

Zusammenfassung.

1. Es wurde die Hitzeresistenz dichter und dünner Aufschwemmungen von Bacterium Coli, Bac. Pyocyaneus und Staphylokokken untersucht, und der Resistenzunterschied dichter und dünner Aufschwemmungen verglichen.

2. Bei Ausschaltung des Einflusses der Keimzahl erwies sich bei allen 3 Bakterienarten der einzelne Keim in einer dichten Aufschwemmung ausnahmslos resistenter als in einer dünneren.

3. Zur Klärung dieser Tatsachen werden wie schon von anderen Autoren Schutzstoffe angenommen, die von den Keimen selbst an das Suspensionsmittel abgegeben werden und in dichten Aufschwemmungen zur Wirkung gelangen.

4. Diese Stoffe wurden durch Membranfiltration von den Bakterien getrennt und vermochten in neuen dünnen und an sich gering resistenten Aufschwemmungen die Widerstandsfähigkeit gegen Hitze ganz erheblich zu steigern.

5. Die Stoffe sind anscheinend unspezifisch, d. h. von Colibakterien abgegebene und isolierte Schutzstoffe vermögen Staphylokokkenemulsionen in ihrer Hitzeresistenz zu fördern und umgekehrt.

Literaturverzeichnis.

Behrens, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**, 388. 1923. — *Eijkmann*, Biochem. Zeitschr. **11**, 12. 1908. — *Ficker*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **29**, 39. 1898. — *Fleischer* und *Amster*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **99**, 209. 1923. — *Göbel*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**, 380. 1923. — *Lange*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 92. 1922. — *v. Lingelsheim*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **37**, 131. 1901. — *Potthoff*, Die Desinfektion **6**, Nr. 1. 1921. — *Reichenbach*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **89**, H. 1/3. 1922.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin.)

Hefe-Ein-Zell-Kulturen mit dem Mikromanipulator.

Von

M. Hahn, F. Schütz und **L. Wámoscher.**

Mit 3 Textabbildungen.

Die von *Péterfi* und *Wámoscher* ausgearbeitete Methode der mikrurgischen Ein-Zell-Kultur mußte den Gedanken nahelegen, sie auch auf die Pilze des Gärungsgewerbes anzuwenden. Gerade dort ist einerseits noch heute der Ausgang von einer Zelle zur Heranzüchtung reiner Kulturen üblich, weil man so am sichersten ist, Zellen von ganz bestimmter morphologischer Beschaffenheit in bezug auf Größe, Sporenbildung, Wandstärke usw. auswählen zu können und weil mannigfache Zusammenhänge von solchen morphologischen Differenzen der Zellen mit dem qualitativen und quantitativen Ablauf des Gärungsprozesses den Sachverständigen aus der großen Erfahrung heraus bekannt sind. Andererseits gewährleistet der Ausgang von einer Zelle am sichersten eine Reinkultur und dient deshalb auch dazu, die durch den Fabrikationsprozeß oft infizierte Masse der Gärungspilze von den verunreinigenden Beimengungen zu befreien. Aber auch das Studium biologischer Einwirkungen bestimmter physikalischer oder chemischer Agentien, wie Temperatur, Nährstoffe, Desinfizientien, aerobe und anaerobe Bedingungen läßt sich in einer für diese Zwecke ausreichenden Genauigkeit nur an Ein-Zell-Kulturen verfolgen und dient auch wieder dazu, neue Zusammenhänge zwischen dem Formenkreis der chemischen Aktivität oder überhaupt dem biologischen Verhalten aufzudecken.

Für alle diese Zwecke hat sich die übliche Reinkultur als nicht ausreichend erwiesen. Selbst die Unterschiede in dem Aussehen der Kolonien sind vielfach nicht groß oder nicht konstant genug, um Differenzen im biologischen Verhalten mit Sicherheit festzustellen oder decken sich nicht mit ihnen — eine Erfahrung, die wir ja auch beim Arbeiten mit pathogenen Bakterien immer wieder machen.

Daraus erklärt sich die vielfache Anwendung, welche namentlich die Tröpfchenkultur nach der Lindnerschen Methode insbesondere zur Heranzüchtung reiner Hefekulturen aus verunreinigten Massen, aber

auch im Bereiche der Milchsäure- und Essigsäuregärung-Industrie findet. Die Lindnersche Methode ist im wesentlichen die alte Pasteursche Verdünnungsmethode in mikroskopischer Ausführung und unter mikroskopischer Kontrolle. Sie ist nicht besonders umständlich, erfordert aber auch Übung, arbeitet im ganzen nach dem Urteil der Sachverständigen zwar nicht mit absoluter Sicherheit, aber doch relativ sicher. Immerhin ist es z. B. bei der Hefereinzüchtung meist nötig, verunreinigende Begleitbakterien durch nachträgliche Säuerung noch abzutöten, und Fehlschläge machen Wiederholungen notwendig. Gerade für biologische Studien aber und für die sichere, rasche und unkomplizierte Ausführung ohne Säuberung schien uns unsere mikrurgische Methode geeigneter, die es erlaubt, die einzelne Zelle sofort ohne irgendwelche Nachbehandlung in ein ihr durchaus adäquates Nährmedium überzuführen und damit auch unkontrollierbaren nachträglichen Einwirkungen chemischer oder biologischer Art vorzubeugen.

Die nachstehenden Ausführungen sollen hauptsächtlich zu Nachuntersuchungen der Sachverständigen dieses Faches anregen, deren Urteil gerade für diesen Fall unbedingt notwendig und maßgebend ist.

Wir verdanken die zu unserer Arbeit notwendigen verunreinigten Hefeproben, die von Brauereien eingesandt waren, dem Entgegenkommen des Instituts für Gärungsgewerbe Berlin. Die Herren Dr. *Glaubitz* und Dr. *Stockhausen* haben uns jede gewünschte Auskunft bereitwilligst erteilt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Die allgemeine Methodik der mikrurgischen Ein-Zell-Kultur haben *Péterfi* und *Wámoscher* in dieser Zeitschrift Bd. 106, H. 1, S. 191 beschrieben; manche Einzelheiten findet man außerdem in der Arbeit von *Wámoscher*, ebenfalls in dieser Zeitschrift Bd. 106, H. 2, S. 421. Um Wiederholungen zu vermeiden, sollen hier nur in aller Kürze die wesentlichsten methodischen Unterschiede angegeben werden.

Die ganze Manipulation gestaltet sich durch die relative Größe der zu isolierenden Hefezellen bedeutend einfacher, als Bakterienisolierungen. Man kann nämlich im Dunkelfeld bereits bei 400 facher Vergrößerung die morphologischen Einzelheiten der Hefezelle in einer zur Differenzierung ausreichenden Weise erkennen. Daher kann man in der hohen feuchten Kammer (Originalkammer von *Péterfi*) mit dem schwachen Präparierwechselkondensor bequem arbeiten. Man verwendet am besten Zeiss Objektiv C (Eigenvergr. 20 fach) mit Okular 20 fach. Bei dieser Vergrößerung sind die verunreinigenden Bakterien im Dunkelfeld deutlich als solche zu diagnostizieren. Durch die Anwendung der hohen feuchten Kammer ist die Instrumentenherstellung (Mikropipette) eine einfache. Das Lumen der Pipette soll ungefähr das anderthalbfache des Durchmessers der zu isolierenden Hefezelle betragen. Man füllt die Pipette mit flüssiger Bierwürze oder noch besser (wegen der optischen Bedingungen)

mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Brauereien schicken ihre verunreinigte Hefeaufschwemmung fast immer in Bierwürze ein. Man kann aus dieser verunreinigten Hefeaufschwemmung, falls es nötig ist, ohne weiteres die Isolierung vornehmen. Nur wenn die Bierwürze *sehr stark* mit Bakterien verunreinigt ist, ist es zweckmäßig, sie etwas mit Bierwürze oder NaCl zu verdünnen.

Abb. 1. Verunreinigte Bierhefe in Bierwürze. Phoku Negativsystem H. Apochromat 4 mm (Zeiss).

Wenn man 24 Stunden Zeit hat, so legt man sich aber besser vorher eine frische Kultur an, indem man mit einigen Ösen der Aufschwemmung ein Bierwürzröhrchen beimpft. Man hat nach 24 Stunden in dieser Vorkultur fast nur frische, fortpflanzungsfähige Hefezellen, aus denen sich selbstverständlich viel leichter und sicherer Ein-Zell-Kulturen anlegen lassen. Bei direkter Isolierung aus der von der Brauerei eingeschickten Hefeprobe kann es, besonders wenn diese einige Tage unterwegs war, leicht vorkommen, daß von ca. 20—30 Ein-Zell-Kulturen vielleicht nur eine einzige angeht. Sehr oft findet man die Hefezellen fast vollkommen überwuchert von verunreinigenden Bakterien in der Aufschwemmung vor. In solchen Fällen wird man beim ersten Ansaugen der gewünschten Hefezelle fast immer noch Bakterien in die Pipette mit einsaugen. Man muß dann durch fortgesetztes Einsaugen und Ausblasen die Hefezelle von den verunreinigenden Bakterien befreien. Nach 3—5 maliger Wiederholung obiger Operation hat man dann

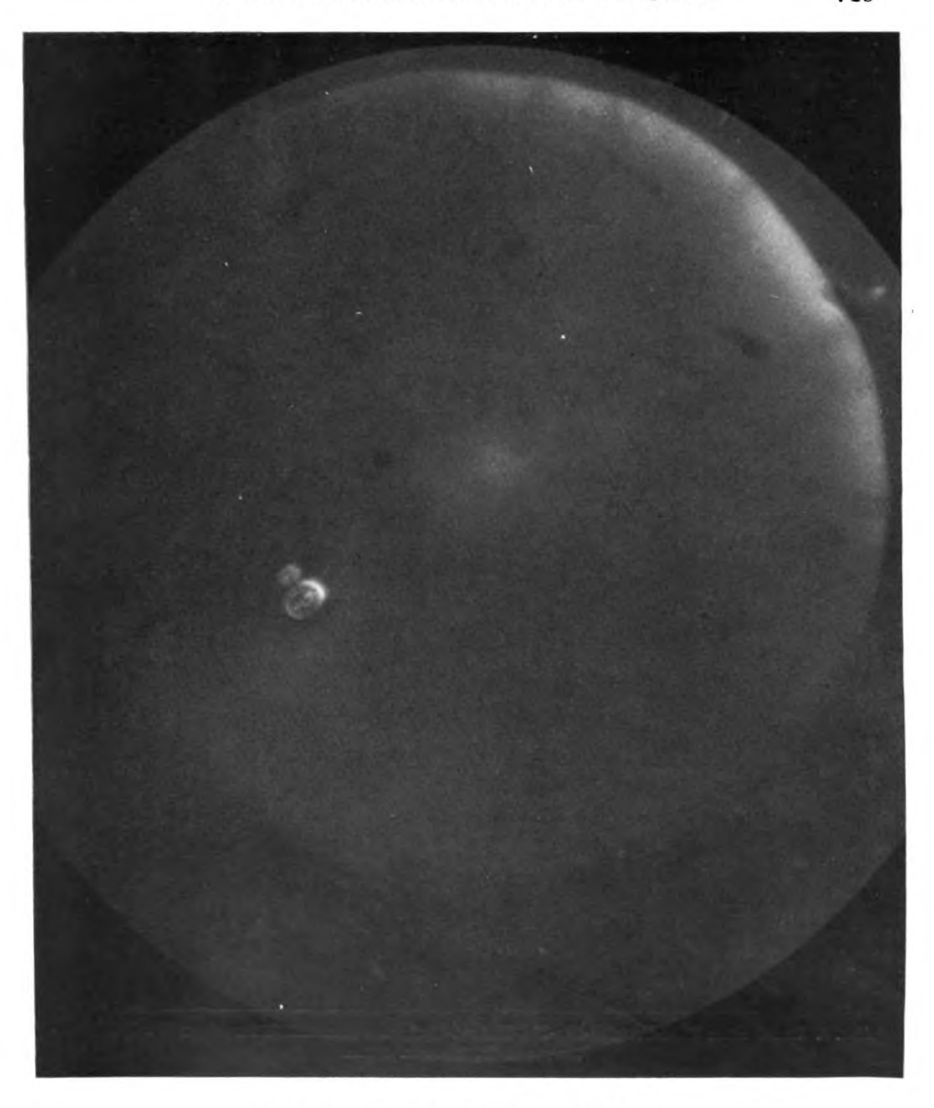


Abb. 2. Isolierte Hefezelle. Vergr. wie Abb. 1.

in einem Tröpfchen nur die zur Ein-Zell-Kultur zu verwendende Hefezelle.

Die Bierwürze enthält fast immer, selbst dann, wenn sie makroskopisch vollkommen klar erscheint, im Dunkelfeld durch ihre Strahlung sehr unangenehm bemerkbare kleine leuchtende Partikelchen, die ungefähr Kokkengröße entsprechen, und die daher dem noch Ungeübten zu Verwechslungen Anlaß geben können. Nach geringer Übung jedoch

wird man diese kleinsten Teilchen durch die Art ihrer Form, ihres Lichtbrechungsvermögens und ihrer Molekularbewegung von Bakterien meist mit großer Sicherheit unterscheiden können.

Will man mit der einzelisolierten Hefezelle eine Tröpfchenkultur anlegen, so bläst man dieselbe in einen auf einem Deckglas vorher angebrachten Bierwürztropfen hinein und verfährt, wie sonst bei Tröpfchen-

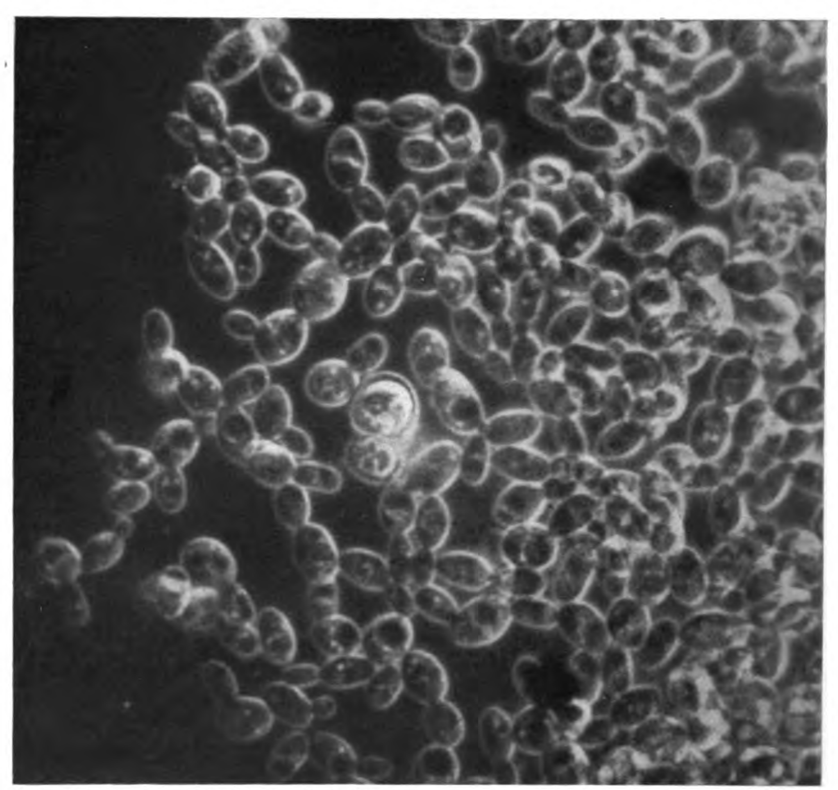


Abb. 3. Rand einer Hefe-Tropfen-Ein-Zell-Kultur. Aufgenommen mit Zeiss schem Phoku, Negativsystem H, Apochr. 4 mm.

kulturen üblich. Man kann aber auch direkt ein gewöhnliches Röhrchen beimpfen und auf die mikroskopische Kontrolle, die ja in diesem Stadium der Isolation nicht mehr unbedingt erforderlich ist, verzichten, indem man den Inhalt der Pipette vollständig in das Kulturröhrchen hineinbläst. Um aber bei dieser Art der Ein-Zell-Kultur Verunreinigungen zu vermeiden, ist es unbedingt notwendig, auf die Sterilität der äußeren Pipettenwand sorgfältig zu achten.

Die Abb. 1 zeigt die Ausgangskultur (von der Brauerei eingeschickte Hefeprobe) mit den vielen verunreinigenden Bakterien und einigen unter-

gärigen Bierhefezellen. Abb. 2 zeigt in einem kleinen Tropfen eine aus obiger Hefeprobe einzelisolierte Hefe und Abb. 3 den Rand einer Tröpfchen-Ein-Zell-Kultur nach 24 Stunden. Alle Abbildungen wurden mit dem Zeissschen Phoku und dem Zeissschen Präparierwechselkondensor für starke Objektive hergestellt und photographisch vergrößert.

Vergleicht man diese neue Methode der Hefe-Ein-Zell-Kultur mit der Lindnerschen Methode, so lassen sich folgende Vorteile der mikrurgischen Methode feststellen:

1. Die Ein-Zell-Kultur dauert kürzere Zeit.

2. Man kann jede *gewünschte* Hefezelle, die man unter dem Mikroskop sieht, isolieren, und ist nicht auf den Zufall wie bei der Lindnerschen Methode angewiesen.

3. Endlich gelingt es in jedem Falle, die Hefezelle direkt, d. h. mit einem Male von verunreinigenden Bakterien zu befreien. Dies letztere war mit der Lindnerschen Methode nur in den seltensten Fällen möglich, da man nur ausnahmsweise in den angelegten kleinen Tröpfchen einen fand, in dem *nur* die Hefezelle *ohne* Begleitbakterien vorhanden war. Selbst dies konnte man bei Durchprüfung der angelegten Tröpfchen im abgeblendeten Hellfeld, wie dies üblich ist, nicht immer einwandfrei entscheiden. Man half sich daher nach angewachsener Ein-Zell-Kultur, in der noch Begleitbakterien vorhanden waren, wie schon oben erwähnt, dadurch, daß man die letzteren durch die bekannte Säurebehandlung beseitigte. Beim mikrurgischen Verfahren ist dies, wie gesagt, nicht nötig.

Außer den eben angeführten Vorteilen ist der Anwendungsbereich der Methode für das Gärungsgewerbe ein mannigfaltiger. Sowohl morphologische wie biologische Untersuchungen lassen sich durch diese Methode bequem und präzis durchführen. Wir hoffen, daß die mikrurgische Methodik zur Lösung mancher derartiger Probleme beitragen wird.

Wir haben mit der soeben beschriebenen mikrurgischen Methode eine sehr große Anzahl von Ein-Zell-Kulturen gemacht und so gut wie stets Reinkulturen erhalten. Zu besonderem Dank sind wir unserer technischen Assistentin Frl. *E. Michaelis-Braun* verpflichtet, die, unsere Methode vollkommen beherrschend, sehr viele Ein-Zell-Kulturen selbständig angelegt hat.

Bemerkungen zur nachstehenden Arbeit.

Von
F. Neufeld.

Jeder, der sich mit Desinfektionsfragen praktisch beschäftigt hat, empfindet die Mängel der uns zur Zeit für die allgemeine Desinfektion, d. h. für die Desinfektion am Krankenbett und bei der Schlußdesinfektion zur Verfügung stehenden chemischen Mittel. Über die seit Jahrzehnten benutzten beiden Mittel, Kresolseife und Sublimat, sind wir eigentlich nicht hinausgekommen und beide haben, wie wohl allgemein zugegeben wird, recht erhebliche Nachteile; ich verweise auf die eingehende Besprechung bei der Mikrobiologenversammlung in Würzburg 1921, insbesondere auf das Referat von *Hailer*. Bei den Kresolpräparaten ist es vor allem der unangenehme Geruch, der die Anwendung in der Praxis außerordentlich erschwert.

Unter diesen Umständen erscheint es dringend erwünscht, nach besseren Mitteln zu suchen und alle Mittel, die auch nur einen Teil der Nachteile vermeiden, die den bisherigen anhaften, erscheinen der Nachprüfung wert. Nun scheint die Möglichkeit gegeben zu sein, Präparate zu finden, die den Kresolen nahestehen und bei mindestens ebenso guter Wirkung frei von dem widerwärtigen Kresolgeruch sind. In den Jahren 1922 und 1923 habe ich gemeinsam mit *Bruno Lange* mehrere Mittel untersucht, die uns von Dr. *Paul Flemming*-Hamburg zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich um Produkte aus sauren Urteerdestillaten, die zum Teil nicht mit Seife, sondern mit anderen ebenfalls aus Urteer gewonnenen Stoffen löslich gemacht waren. Wie *Lange* festgestellt hat, hat der Seifenzusatz insofern eine eigentümliche Wirkung, als er zwar die Abtötung von Bakteriensuspensionen erleichtert, aber die praktisch weit wichtigere Desinfektion von infizierten Gegenständen (Baumwolle, Wolle, Holz) erschwert oder doch wesentlich verzögert, so daß zum mindesten während der ersten Stunden die an derartigen infizierten Objekten befindlichen Erreger durch Kresolseife schlechter als durch reine Kresollösung abgetötet werden — wie *Hailer* annimmt deswegen, weil an den Objekten die oberflächenaktivere Seife sich durch Adsorptionsvorgänge anreichert und daher die Konzentration des Kresols sich verringert. *Hailer* hat

daher vorgeschlagen, von alkaliversetzten Kresolen in der Praxis mehr Gebrauch zu machen.

Unter den von Dr. *Flemming* erhaltenen Präparaten fand sich eins, das frei von Kresolgeruch war und in der Desinfektionswirkung der Kresolseife erheblich überlegen war. Leider konnten wir die Untersuchungen nicht fortsetzen, da wir weitere Proben nicht erhalten konnten.

Anfang dieses Jahres wurde dem Institut von Herrn Dr. *Heimannsfeld* in Mülheim-Ruhr ein neues Desinfektionsmittel übergeben, das sich in orientierenden Versuchen als gut wirksam erwies und frei von Kresolgeruch war, so daß eine nähere Prüfung von Interesse erschien. Diese wurde nach den von *B. Lange* in mehreren Arbeiten dargelegten Grundsätzen ausgeführt; über ihre Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

(Aus dem Institut „Robert Koch“.)

Untersuchungen über ein neues Desinfektionsmittel („Ufinol“).

Von

Dr. **Schmidt-Weyland** und Dr. **Költzsch.**

Die Ufinol-G. m. b. H., Mülheim-Ruhr, hat ein neues Desinfektionsmittel hergestellt, das sie in Kürze in den Handel zu bringen beabsichtigt.

Das Mittel ist nach den Angaben der Gesellschaft aus Ölanteilen säureähnlichen Charakters eines Spezialteers hergestellt. Dieser Spezialteer wird durch trockene Destillation bituminöser Stoffe bei bestimmten Temperaturen gewonnen. Die Körper werden mit Ölsäuren emulgiert, und zwar derart, daß das Verhältnis von wirksamem Agens zu Emulgierungsmittel ungefähr 1 : 1,5 beträgt (genauer 4,1 : 5,9. Das Mittel enthält also 59% der wirksamen Substanz.)

Dem Mittel ist ein Parfüm zugesetzt, das den dieser Gruppe von Desinfektionsmitteln anhaftenden typischen Geruch verdeckt. Das Parfüm ist als nicht unangenehm zu bezeichnen.

Das Mittel löst sich gut in allen Verdünnungen, allerdings unter Trübung, es gibt also eine feine Emulsion. Bei Verdünnung in Leitungswasser kommt dazu noch der Niederschlag durch die Seife. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über den Trübungsgrad im Vergleich mit Kresol, Kresolseife und Creolin (*Pearson*).

Tabelle 1.

Mittel	2%	1%	0,6%	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%
a) Lösung in Leitungswasser.										
Das zu prüfende Mittel . . .	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ + +	+ +	+	±	−
Kresol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Kresolseife . .	−	−	−	+	+ +	+ +	+	+	+	±
Creolin . . .	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ +	+	+
b) Lösung in destilliertem Wasser.										
Das zu prüfende Mittel . . .	+	+ + + +	+ + + +	+ +	+	±	?	?	−	−
Kresol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Kresolseife . .	−	−	−	−	−	+	±	±	±	?
Creolin . . .	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ +	+	+	±

Bei der Prüfung der Desinfektionswirkung wurde zum Vergleich Kresolseife, Kresol und Creolin (*Pearson*) herangezogen, und zwar in

erster Linie immer das Mittel, welches erfahrungsgemäß bei der entsprechenden Methode als das wirksamste gelten konnte.

Die Prüfung fand bei allen Methoden gegenüber B. coli und Staphylokokken statt. Die Aufschwemmung wurde aus 8 verschiedenen Laboratoriumsstämmen hergestellt. Es wurden zu dem Zweck 24stündige Schrägagarkulturen mit je 10 ccm Leitungswasser abgeschwemmt, gemischt und kurz zentrifugiert, um die Gesamtaufschwemmung von gröberen Partikeln zu befreien.

Die Desinfektionsmittel wurden stets der Praxis entsprechend in (nicht abgekochtem) Leitungswasser gelöst. Die in den Tabellen mitgeteilten Prozentzahlen sind bei allen Mitteln absolute, d. h. bei der Angabe: „1 proz. Lösung" kamen von dem zu prüfenden Desinfektionsmittel 1,73 Teile des Gesamtmittels auf 100 Teile Wasser, da das Mittel 59% desinfizierendes Agens enthielt.

Die Prüfung fand nach der Suspensions- und Keimträgermethode sowie im Entwicklungshemmungsversuch statt. Außer den tabellarisch mitgeteilten und besprochenen Versuchen sind bei allen Methoden Parallelversuche angestellt worden, deren Ergebnisse im wesentlichen mit dem angegebenen übereinstimmen.

I. *Suspensionsversuche.*

Hinsichtlich der Technik haben wir uns wie auch in den folgenden Versuchen an die Angaben von *B. Lange* gehalten.

Von der Bakterienaufschwemmung kam 1 Tropfen auf 2 ccm Desinfektionsmittel. Da 6 ccm Lösung verwandt wurden, kamen 3 Tropfen zur Einsaat. Zur Aussaat wurde nach den in den Tabellen angegebenen Zeiten je ein Tropfen an den oberen Rand des Schrägagars gebracht, so daß der Tropfen über den ganzen Agar herablief. Daß der Tropfen ohne den Agar zu benetzen herablief, kam nur ganz vereinzelt vor. Bei der Gesamtbeurteilung dürfte dieses seltene Vorkommnis keine Rolle spielen.

Tabelle 2. *Prüfung gegenüber B. coli.*

%	5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.	8 Std.	24 Std.
a) Das zu prüfende Mittel.							
0,6	—	—	—	—	·	·	·
0,4	—	—	—	—	—	—	·
0,2	—	—	—	—	—	—	—
0,1	++	++ (+++)	—	—	—	—	—
0,05	++	++ (+++)	+ (++)	+ (++)	+	+ (++)	+
0,025	·	·	·	·	·	·	—
b) Kresolseife.							
0,6	++ (+++)	+ (++)	—	—	·	·	·
0,4	++ (+++)	+ (++)	—	—	—	—	·
0,2	++ (+++)	+ (++)	++	++	+	+	—
0,1	++ (+++)	++ (+++)	+ (++)	++	++	++	+
0,05	++ (+++)	++ (+++)	++	++	++ (+++)	++	+++
0,025	·	·	·	·	·	·	+++

Tabelle 3. *Prüfung gegenüber Staphylokokken.*

%	5 Min	10 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	24 Std.
			a) Das zu prüfende Mittel.				
0,6	–	–	–	–	·	·	·
0,4	–	–	–	–	–	–	·
0,2	(+)	+	+	–	–	–	–
0,1	+ (++)	++ (+++)	++ (+++)	+	(+)	(+)	–
0,05	+ (++)	++	+	(+)	–	–	–
0,025	·	·	·	·	·	·	–
			b) Kresolseife.				
0,6	+++	–	–	–	·	·	·
0,4	–	–	–	–	–	–	·
0,2	++ (+++)	++ (+++)	+	++	(+)	–	–
0,1	++ (+++)	++ (+++)	++ (+++)	++	++	+ (++)	–
0,05	++ (+++)	++	++	++	++ (+++)	+ (++)	–
0,025	·	·	·	·	·	·	++

Zeichen: (+): Wachstum erst nach 48 Stunden.
+: 1—10 Kolonien.
++: Über 10 bis etwa 50 Kolonien.
+++: dichter Rasen.

In beiden Versuchen wirkte das neue Mittel erheblich stärker als Kresolseife, sowohl bei kurzer wie bei langer Einwirkungszeit. Gegenüber B. coli war dabei der Unterschied noch größer als gegenüber Staphylokokken.

Ein weiterer hier nicht tabellarisch wiedergegebener Versuch mit Typhusbacillen hatte, wie zu erwarten, ein analoges Ergebnis, wie der Versuch mit B. coli.

Tabelle 4. *Prüfung gegenüber B. coli.*

%	1 Min.	5 Min.	10 Min.	1 Std.	3 Std.	24 Std.
			a) Das zu prüfende Mittel.			
0,6	–	–	–	–	–	·
0,4	–	–	–	–	–	–
0,2	–	–	++	–	–	–
0,1	+++	+++	–	–	–	–
0,05	·	·	+++	+++	+	(+)
0,025	·	·	·	·	·	+
			b) Creolin.			
0,6	+++	++	++	–	–	·
0,4	+++	++	+	–	–	–
0,2	+++	+++	+++	+	–	–
0,1	+++	+++	+++	+++	+	–
0,05	·	·	+++	+++	+++	+++
0,025	·	·	·	·	·	+++

Das Mittel zeigt sich gegenüber B. coli besonders deutlich nach kurzen Einwirkungszeiten in allen Konzentrationen dem Creolin überlegen. Auch in früheren Versuchen hat sich gezeigt, daß Creolin ein langsam wirkendes Desinfiziens ist.

II. Keimträgermethode.

Bemerkungen zur Technik: Es wurden nach *Hailers* Vorgang Läppchen aus Batist benutzt, von etwa 1 : 2 cm Größe. Auf jedes Läppchen kamen 2 Tropfen Bakterienaufschwemmung. Pro Läppchen wurden 4 ccm Desinfektionslösung zugesetzt. Das Desinfiziens wurde auf die Läppchen gegossen, ehe die Bakterienaufschwemmung auf den Läppchen getrocknet war. Alle Läppchen, die einer gleichen Konzentration des Mittels ausgesetzt werden sollten, kamen zusammen in eine Petrischale. Es wurde darauf geachtet, daß die Läppchen nebeneinander lagen.

Nach den entsprechenden Zeiten wurden die Läppchen durch 3 Schälchen geführt und durch mehrmaliges Ausschwenken in destilliertem Wasser von dem anhaftenden Desinfiziens befreit. Sodann wurde je ein Läppchen in je ein Bouillonröhrchen geworfen.

Tabelle 5. *Prüfung gegenüber B. coli.*

%	3 Min.	10 Min.	30 Min.	1 Std.	3 Std.	24 Std.
			a) Das zu prüfende Mittel.			
1	—	—	—	—	—	—
0,75	—	—	—	—	—	—
0,5	—	—	—	—	—	—
0,25	—	—	—	—	—	—
0,1	++	++	+	—	—	—
			b) Kresol.			
1	—	—	—	—	—	—
0,75	—	—	—	—	—	—
0,5	+	—	—	—	—	—
0,25	++	++	++	++	—	—
0,1	++	++	++	++	++	—

Tabelle 6. *Prüfung gegenüber Staphylokokken.*

%	3 Min.	10 Min.	30 Min.	1 Std.	3 Std.	24 Std.
			a) Das zu prüfende Mittel.			
1	+	—	—	—	—	—
0,75	+	+	—	(+)	—	—
0,5	++	++	++	++	—	—
0,25	++	++	+	++	—	—
0,1	++	++	++	++	(+)	—
			b) Kresol.			
1	(+)	—	—	—	—	—
0,75	++	++	+	(+)	—	—
0,5	++	++	++	++	—	—
0,25	++	++	++	++	++	—
0,1	++	++	++	++	++	—

Zum Vergleich wurde Kresol genommen, da **Kresol in Keimträgerversuchen erfahrungsgemäß wirksamer ist als Kresolseife, besonders** nach kürzerer Einwirkungszeit. ***Gegenüber B. coli erscheint auch in***

diesem Fall das neue Mittel beträchtlich besser als Kresol, gegenüber Staphylokokken nur um ein geringes besser.

Die Wirkung ist aber nicht so gut, wie nach dem Suspensionsversuch zu erwarten wäre, wobei zu berücksichtigen ist, daß im Suspensionsversuch zum Vergleich Kresolseife genommen wurde, die früheren Erfahrungen von *Lange* zufolge bei dieser Versuchsanordnung erheblich besser wirkt als reines Kresol. Das neue Mittel wird also im Keimträgerversuch offenbar durch Adsorptionsvorgänge stärker beeinträchtigt als Kresol.

III. Entwicklungshemmungsversuch.

Bemerkungen zur Technik: Die Desinfektionsmittel wurden durch Lösung in Bouillon in den entsprechenden Konzentrationen dargestellt.

Eingesät wurde 1 Tropfen der Bakterienaufschwemmung auf 2 ccm solcher Bouillon-Desinfiziens-Lösungen. Die absolute Menge beträgt 3 Tropfen auf 6 ccm.

Die Beobachtung erstreckt sich über 6 Tage.

Tabelle 7. *Prüfung gegenüber Staphylokokken.*

Mittel	0,6%	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%
Das zu prüfende Mittel	—	—	—	—	—	(+)	+	+
Kresol	—	—	—	+	+	+	+	+
Kresolseife	—	—	—	—	(+)	+	+	+
Creolin	—	—	—	—	—	—	+	+

Tabelle 8. *Prüfung gegenüber B. coli.*

Mittel	0,6%	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%
Das zu prüfende Mittel	—	—	—	((+))	(+)	+	+	+
Kresol	—	—	—	—	+	+	+	+
Kresolseife	—	—	—	+	+	+	+	+
Creolin	—	—	—	+	+	+	+	+

Zeichen: +: Wachstum nach 24 Stunden.
(+): Wachstum nach 48 Stunden.
((+)): Wachstum nach 72 Stunden.

Nach Tab. 7 zeigt das neue Mittel gegenüber Staphylokokken eine stärkere entwicklungshemmende Wirkung als Kresolseife und eine beträchtlich stärkere als Kresol. Das Creolin, dessen relativ schlechte baktericide, aber stark entwicklungshemmende Wirkung bekannt ist, erwies sich dagegen etwas stärker entwicklungshemmend als das neue Mittel. In einem anderen hier nicht tabellarisch wiedergegebenen Versuch mit Staphylokokken war das Verhältnis umgekehrt, d. h. bei dem neuen Mittel war eine um ein geringeres stärkere Entwicklungshemmung zu konstatieren als bei dem Creolin.

Bei der Prüfung gegenüber B. coli (Tab. 8) zeigte das neue Mittel bei einer Konzentration von 0,1% erst nach 72 Stunden Wachstum, während bei dieser Konzentration bei Kresolseife und Creolin schon nach 24 Stunden Wachstum festzustellen war. Etwas stärker entwicklungshemmend war in diesem Versuch das Kresol (0,05%). In einem früheren Parallelversuch war im Vergleich mit Kresol das Verhältnis umgekehrt, d. h. bei Kresol war in einer Konzentration von 0,05%, bei dem neuen Mittel erst in 0,025% Wachstum eingetreten.

Hiernach wirkt das neue Mittel etwa ebenso stark entwicklungshemmend wie Creolin und nur wenig stärker als Kresolseife. Wenn es daher beiden Mitteln im Suspensionsversuch weit überlegen ist, so kann das nicht durch Entwicklungshemmung bedingt sein.

Ergebnisse.

Im Suspensionsversuch wirkte das neue Mittel „Ufinol" sowohl bei Beobachtung nach kurzer wie nach langer Zeit (bis 24 Stunden) erheblich stärker als Kresolseife, besonders gegenüber B. coli.

Im Keimträgerversuch mit Batistläppchen wurde statt Kresolseife reines Kresol zum Vergleich genommen, das erfahrungsgemäß in Versuchen mit Keimträgern, wenigstens bei Entnahmen nach kürzerer Zeit, wirksamer als Kresolseife ist. Auch hier zeigte sich das neue Mittel gegen Staphylokokken nur wenig besser, gegen Coli nicht unbeträchtlich besser als Kresol. Es ist nicht zu verkennen, daß es im Keimträgerversuch offenbar durch Adsorptionsvorgänge in seiner Wirkung weit stärker beeinträchtigt wird als Kresol.

Im Entwicklungshemmungsversuch wurde das „Ufinol" auch mit Creolin (*Pearson*) verglichen, von dem bekannt ist, daß es relativ schlecht bakterieid, aber stark entwicklungshemmend wirkt. Es zeigte sich, daß das neue Mittel etwas stärker entwicklungshemmend wirkt als Kresolseife und annähernd gleich stark wie Creolin, während es im Suspensionsversuch sehr viel besser keimtötend wirkt. Hiernach dürfte der günstige Ausfall der Suspensionsversuche nicht auf Entwicklungshemmung zurückzuführen sein.

Auch wenn man von den Suspensionsversuchen absieht, so bleibt bestehen, daß das „Ufinol" im Keimträgerversuch gegenüber Colibacillen, deren Beeinflussung bei der hygienischen Desinfektion wichtiger ist als die Wirkung auf Staphylokokken, dem Kresol deutlich überlegen ist, und zwar sowohl bei frühzeitiger Entnahme wie nach 24stündiger Einwirkung; nach früheren Versuchen ist anzunehmen, daß ein Vergleich mit Kresolseife im Keimträgerversuch noch günstiger ausfallen würde.

Hierzu kommt als weiterer Vorzug das Fehlen des unangenehmen Kresolgeruchs.

Autorenverzeichnis.






18924
University o

